

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Die Rolle der Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinase M in der  
Polarisierung von Makrophagen und der Pathogenese eines  
chronisch-auf-akuten Nierenversagens**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Regina Anna Gröbmayer**

aus Ebersberg

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Fritz Krombach  
PD Dr. Bärbel Lange-Sperandio  
Prof. Dr. Heiko Adler

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. hum. biol. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2017

## **Vorbemerkung**

Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 2011 bis Dezember 2013, am Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Poliklinik IV, des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München, durchgeführt. Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

## **Rechtliche Grundlagen**

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche wurde darauf geachtet, das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Alle mit dieser Dissertation verbundenen Tierexperimente waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

## **Förderung des Projekts**

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“, durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, unterstützt.

## **Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen / Präsentationen hervor:**

- **Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy.**  
Lech M\*, Gröbmayer R\*, Ryu M, Lorenz G, Hartter I, Mulay SR, Susanti HE, Kobayashi KS, Flavell RA, Anders HJ.  
J Am Soc Nephrol. 2014 Feb;25(2):292-304. doi: 10.1681/ASN.2013020152. Epub 2013 Dec 5  
\*geteilte Erstautorenschaft
- **Posterpreis der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2012**  
Kategorie: Nephrologie
- **1. Platz „Fellows night“ Nephrologisches-Forum München 2012**

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich, **Regina Anna Gröbmayer**, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

**„Die Rolle der Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinase M in der Polarisierung von Makrophagen und der Pathogenese eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens“**

selbstständig verfasst habe. Außer der angegebenen, keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle, zur Erlangung eines akademischen Grades, eingereicht wurde.

Albaching, 02.02.2018



**Gewidmet meinen Eltern**  
**in großer Dankbarkeit**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 Das akute Nierenversagen.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Klinischer Stellenwert des akuten Nierenversagens.....	2
1.1.2 Definition und Klassifikation.....	3
1.1.3 Ätiologie des akuten Nierenversagens.....	4
1.1.4 Pathophysiologie der ischämischen Nierenschädigung.....	5
<b>1.2 Die chronische Niereninsuffizienz.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Definition, Klassifikation, Epidemiologie und Ätiologie.....	8
1.2.2 Das chronisch-auf-akute Nierenversagen.....	10
<b>1.3 Das Immunsystem.....</b>	<b>14</b>
1.3.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem.....	14
1.3.2 Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems.....	15
1.3.3 Toll-like-Rezeptoren.....	17
1.3.4 Interleukin-1 receptor associated kinase M.....	19
<b>1.4 Makrophagen-Phänotypen in renaler Inflammation und Regeneration.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Der Einfluss von IRAK M auf das akute Nierenversagen.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Ziel des Projektes und Hypothese.....</b>	<b>26</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>29</b>
2.1.1 Geräte.....	29
2.1.2 Chemikalien.....	30
2.1.3 Tierhaltung und Tierversuche.....	31
2.1.4 Zellkultur.....	32
2.1.5 Histologie.....	34
2.1.6 Molekularbiologie.....	35
2.1.7 Durchflusszytometrie.....	37
<b>2.2 Methoden.....</b>	<b>38</b>
2.1.1 Tierexperimentelle Methoden.....	38
2.1.2 Zellkultur.....	41
2.1.3 Histologie.....	44
2.1.4 Mikrodissektion.....	46
2.1.5 Molekularbiologie.....	46
2.1.6 Durchflusszytometrie = FACS (fluorescence-activated cell sorting).....	49
2.1.7 Statistische Auswertung.....	50

<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Basale Expression von IRAK M in murinen Organen.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Gesteigerte Expression von IRAK M in Immunzellen durch LPS.....</b>	<b>53</b>
<b>3.3 Erhöhte Expression von IRAK M nach Ischämie/Reperfusion durch Immunzellen.....</b>	<b>55</b>
<b>3.4. Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung durch eine längere Ischämiezeit.....</b>	<b>57</b>
<b>3.5 IRAK M verhindert die Bildung eines chronisch-auf-akuten Nierenschadens.....</b>	<b>59</b>
3.5.1 Die vermehrte Expression von IRAK M verhindert die Entstehung atropher Nieren.....	59
3.5.2 IRAK M verhindert den Verlust proximaler Tubulussegmente.....	61
3.5.3 Verlust proximaler Tubulussegmente durch fehlende Proliferation verbliebener Epithelzellen.....	63
3.5.4 Bildung atubulärer Glomeruli durch Schädigung der glomerulär-tubulären Verbindungszone.....	65
3.5.5 IRAK M verhindert die übermäßige Produktion von interstitieller Fibrose.....	67
3.5.6 Verstärkte Produktion profibrotischer Marker durch den Mangel an IRAK M.....	70
<b>3.6 Persistente Entzündung in den atrophischen Nieren durch die IRAK M Defizienz.....</b>	<b>72</b>
<b>3.7 Einfluss der IRAK M-Defizienz auf die Makrophagen.....</b>	<b>74</b>
3.7.1 Vermehrte Invasion proinflammatorischer Makrophagen durch den IRAK M-Mangel.....	74
3.7.2 Makrophagen durch IRAK M Defizienz in proinflammatorischem Zustand.....	76
3.7.3 Vermehrte Induktion von M1- nicht aber von M2-typischen Markern in Makrophagen durch die IRAK M-Defizienz.....	78
<b>3.8 TNF-alpha Blockade verbessert den Phänotyp der IRAK M defizienten Mäuse.....</b>	<b>79</b>
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Entzündung als Teil der Pathogenese des chronisch-auf-akuten Nierenversagens.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Einfluss von IRAK M auf die Entzündungsreaktion.....</b>	<b>85</b>
<b>4.3 Einfluss proinflammatorischer Makrophagen auf die Wundheilung.....</b>	<b>86</b>
<b>4.4 Ursache der Fibrose im chronisch-auf-akuten Nierenversagen.....</b>	<b>88</b>
<b>4.5 Risikofaktoren für die Entwicklung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens.....</b>	<b>89</b>
<b>4.6 Mögliche Therapieansätze für das chronisch-auf-akute Nierenversagen.....</b>	<b>90</b>
<b>4.7 Limitationen und Grenzen der Arbeit.....</b>	<b>92</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>94</b>
<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>107</b>

# **Kapitel 1**

## **Einleitung**

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das akute Nierenversagen**

### **1.1.1 Klinischer Stellenwert des akuten Nierenversagens**

Bei Patienten mit verschlechterter Nierenfunktion wird klassischerweise zwischen einem akuten Nierenversagen (ANV) und einer chronischen Niereninsuffizienz (CNI) unterschieden. Beiden gemeinsam sind eine erhöhte Konzentration harnpflichtiger Substanzen im Serum sowie eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate. Beide werden in unterschiedliche Stadien eingeteilt, welche das Ausmaß der Erkrankung widerspiegeln, und beide werden bei fortgeschrittener renaler Dysfunktion mit einer Hämodialyse behandelt [1].

Das ANV ist gekennzeichnet durch einen plötzlichen Anstieg des Serumkreatinins verbunden mit einer verminderten Urinausscheidung [2]. Abhängig vom Schweregrad und der Dauer des Nierenfunktionsausfalls kommt es zu metabolischen Entgleisungen, Störungen im Wasserhaushalt und negativen Effekten auf andere Organsysteme. Die Bedeutung des ANV in der Medizin hat sich in den vergangenen Jahren stark gewandelt. Wurde es früher noch als ein mit Nierenersatztherapie leicht zu behandelndes Organversagen angesehen, hat man heutzutage durch Studien erkannt, dass das ANV einen weitaus gewichtigeren Einfluss auf die Prognose des Patienten hat. So zeigten Levy et al., dass Patienten mit Kontrastmittel-induziertem Nierenversagen ein 6,5-fach höheres Risiko für einen tödlichen Ausgang hatten als Patienten mit einer vergleichbaren Erkrankung und Kontrastmittelexposition ohne ein ANV. Die erhöhte Sterblichkeitsrate wurde durch das vermehrte Auftreten systemischer Komplikationen, wie Sepsis und respiratorischer Insuffizienz verursacht [3]. Intensivpatienten mit einem ANV und Nierenersatztherapie hatten in einer Studie von Metnitz et al., ein 4-fach höheres Sterblichkeitsrisiko im Vergleich zu Intensivpatienten mit vergleichbarer Schwere ihrer Grunderkrankung, aber ohne ANV [4]. Das ANV wird nicht mehr nur als ein alleiniges Problem der Niere angesehen, sondern als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalitätsrate und als eine Erkrankung, die Auswirkungen auf den kompletten Organismus hat [5].

**Tabelle 1: Konsequenzen des akuten Nierenversagens für den Gesamtorganismus**

Tabelle nach [5].

Organsystem	Durch ANV ausgelöste Pathophysiologie
Kardiovaskuläres System	Hyperzirkulation, Kardiomyopathie, Perikarditis, Anämie, Thrombozytopenie, Hämorrhagische Diathese
Lunge	Ödeme, Alveolitis, Pneumonie, alveoläre Blutungen
Gastrointestinaltrakt	Motilitätsstörungen, Erosionen, Ulzerationen, Blutungen, Pankreatitis, Kolitis
Nervensystem	Neuropathie, Enzephalopathien
Muskuloskelettales System	Myopathien
Immunsystem	Aktivierung der zellulären und humoralen Immunabwehr
Metabolismus	Insulinresistenz, Hyperlipidämie, Aktivierung des Proteinkatabolismus, Verlust von Antioxidantien

### 1.1.2 Definition und Klassifikation

Lange Zeit fehlte eine genaue Definition und Stadieneinteilung des ANV, was vor allem die Vergleichbarkeit von Studien stark beeinträchtigt hat. Dadurch variierte die Inzidenzrate, je nach Studie und Patientenkollektiv, zwischen ein Prozent und 31 Prozent. Ebenso verhält es sich mit der Mortalitätsrate, welche zwischen 19 Prozent und 83 Prozent schwankt [6]. Um diesem Chaos entgegenzuwirken, entwickelte die *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI) die RIFLE-Kriterien. Diese teilen das ANV nach den Kreatinin-Werten, dem Harnzeitvolumen und der Dauer der Nierenersatztherapie in 5 Stadien: Risk, Injury, Failure, Loss und Endstage Renal Disease (ESRD). Die RIFLE-Kriterien wurden durch das *Acute Kidney Injury Network* (AKIN) erweitert. Ihre Stadieneinteilung berücksichtigt zusätzlich eine dynamische Komponente [7]. 2012 wurde schließlich die KDIGO Guideline zum ANV veröffentlicht, welche RIFLE und AKIN vereint und das ANV in die Stadien 1-3 einteilt.

Für die Diagnosestellung eines ANV, muss mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt werden: Ein Anstieg des Serumkreatinins um mindestens 0,3 mg/dl - innerhalb von 48 Stunden, ein Anstieg des Serumkreatinins auf mindestens das 1,5-fache eines bekannten oder angenommenen Ausgangswerts - innerhalb von 7 Tagen, oder ein Abfall der Urinausscheidung auf weniger als 0,5 ml/kg Körpergewicht/Stunde für mindestens 6 Stunden [8].

**Tabelle 2: Vergleich der Stadieneinteilung des akuten Nierenversagens nach KDIGO, AKIN und RIFLE Tabelle nach [9]**

Stadium	Serum-Kreatinin			Urin-Ausscheidung KDIGO/AKIN/ RIFLE
	KDIGO	AKIN	RIFLE	
<b>I Risk</b>	Anstieg auf das 1.5–1.9-fache des Ausgangswerts Oder Anstieg um > 0.3 mg/dl in 48 Stunden	Anstieg um > 0.3 mg/dl Oder Anstieg auf das 1.5- bis 2-fache des Ausgangswerts	Anstieg auf das 1,5-fache des Ausgangswerts Oder GFR Abfall > 25%	<0.5 ml/kg/h für 6–12 Stunden
<b>II Injury</b>	Anstieg auf das 2.0–2.9-fache des Ausgangswerts	Anstieg auf das 2- bis 3-fache des Ausgangswerts	Anstieg auf das 2-fache des Ausgangswerts Oder GFR Abfall > 50%	<0.5 ml/kg/h für >12 Stunden
<b>III Failure</b>	Anstieg auf das 3.0-fache des Ausgangswerts Oder Kreatinin > 4.0 mg/dl Oder Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie Oder bei Patienten < 18 Jahren, Abfall der GFR auf <35 ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	Anstieg > 3-fach des Ausgangswerts Oder Kreatinin > 4.0 mg/dl mit einem akutem Anstieg > 0,5 mg/dl Oder Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie	Anstieg > 3-fach des Ausgangswerts Oder GFR Abfall > 75 % Oder Kreatinin > 4 mg/dl mit einem akutem Anstieg > 0,5 mg/dl	<0.3 ml/kg/h für 24 Stunden oder Anurie für 12 Stunden
<b>Loss</b>			Persistierendes Nierenversagen > 4 Wochen	
<b>ESRD</b>			Terminales Nierenversagen > 3 Monate	

### 1.1.3 Ätiologie des akuten Nierenversagens

Klassischerweise werden die Ursachen des ANV eingeteilt in prärenal, intrarenal und postrenal. Prärenales Nierenversagen wird durch renale Hypoperfusion infolge systemischer Hypovolämie oder gestörter renaler Hämodynamik verursacht [10]. Im Rahmen des prärenalen, funktionellen Nierenversagens wird die eigentliche Struktur der Niere bewahrt und der Schaden ist theoretisch

weitestgehend reversibel. Bleibt die Hypovolämie jedoch zu lange bestehen, kommt es zu einer ischämischen Schädigung des Nierenparenchyms und zum Übergang in ein intrarenales Nierenversagen. Beim postrenalen Nierenversagen ist die Niere primär gesund und wird durch einen Stau in den ableitenden Harnwegen geschädigt. Der angestaute Urin führt zu einem Anstieg des luminalen Drucks, was den Filtrationsdruck entgegen wirkt und die GFR sinken lässt [11]. Ursachen für die Obstruktion sind unter anderen Prostatahyperplasie, Aortenaneurysmen, intraabdominelle oder retroperitoneale Raumforderungen. Auch hier sind Folgeschäden, bei rechtzeitiger Beseitigung der Obstruktion, vermeidbar. Im Gegensatz hierzu kommt es beim intrarenalen Nierenversagen zur Schädigung des Nierenparenchyms, was sowohl die Nierenkörperchen, den Tubulusapparat, das Interstitium und auch die Blutgefäße betreffen kann. Die häufigste Ursache hierfür ist eine akute Tubulusnekrose, verursacht durch nephrotoxische Substanzen oder einen Ischämie/Reperfusions-Schaden [10].

### **1.1.4 Pathophysiologie der ischämischen Nierenschädigung**

Bei dem durch Ischämie und Reperfusion verursachten ANV kommt es zu einer mangelnden Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen, sowie zu einem fehlenden Abtransport von Stoffwechselabfallprodukten. Dadurch kommt es zu einer Schädigung der tubulären Zellen und in schweren Fällen zur akuten Tubulusnekrose. Die Folgen sind ein Ausfall der Nierenfunktion mit Veränderungen im Wasser- und Elektrolythaushalt des Körpers und der Akkumulation von harnpflichtigen Substanzen. Die pathophysiologischen Prozesse auf zellulärer Ebene im ANV sind vielfältig und beeinflussen sich gegenseitig [12].

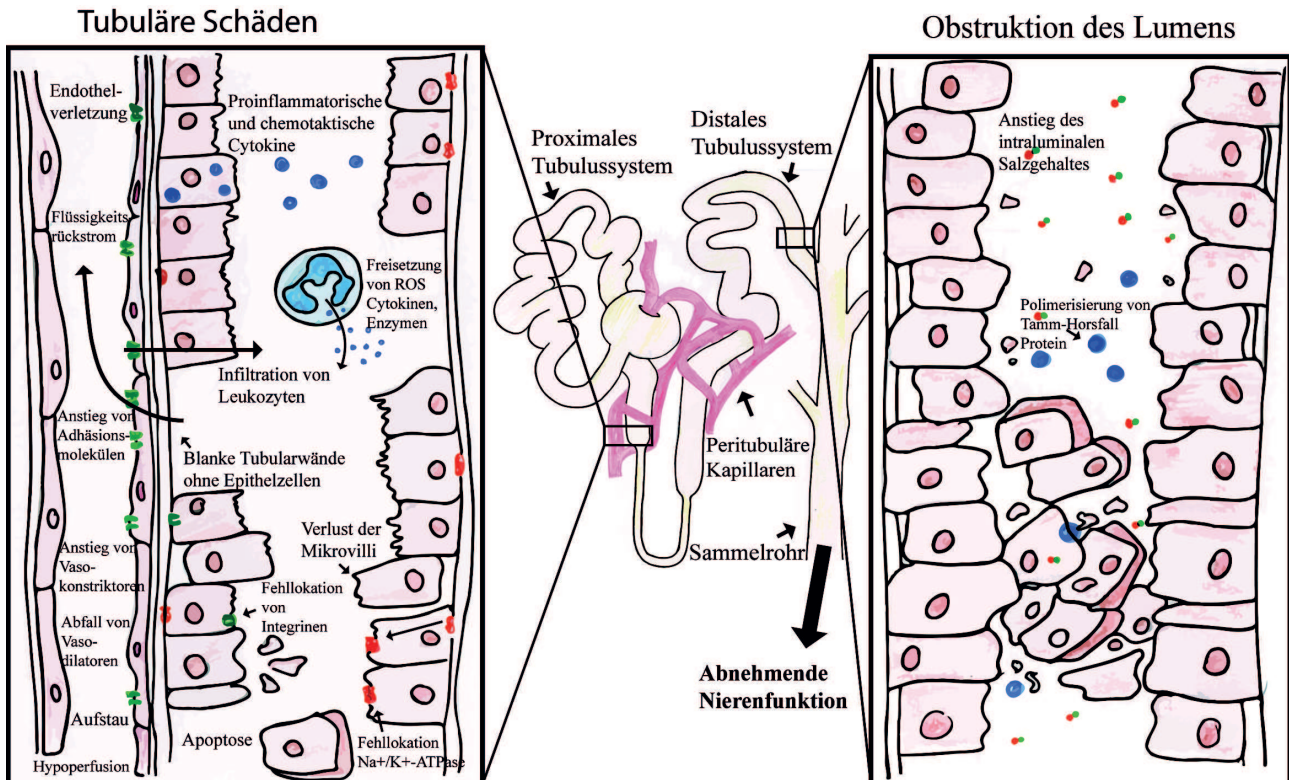
Durch den Sauerstoffmangel kommt es zu metabolischen Veränderungen in den betroffenen Zellen mit einem Abfall des Energieträgers ATP. Dies führt dazu, dass die normalen Stoffwechselvorgänge in der Zelle nicht erhalten werden können und Störungen im Zytoskelett entstehen. Folgen sind der Verlust von Zell-Zell-Kontakten und des Bürstensaums, wodurch es zur Ablösung von Zellen und Zellbestandteilen mit nachfolgender Obstruktion des tubulären Lumens kommt. Eine weitere Folge ist die fehlerhafte Lokalisation von Transportern in den Tubuluszellen. Die Natrium-Kalium-ATPase ist normal am basalen Pol der Tubuluszelle verankert und an der Rückresorption von Natrium beteiligt. Durch die Störung im Zytoskelett wird sie nach apikal verlagert [11]. Dadurch erhöht sich die Salzkonzentration im Lumen, was erstens über den tubulo-glomerulären Feedback eine weitere Reduktion der GFR bewirkt [12] und zweitens zum Ausfall von Tamm-Horsfall Protein und einer weiteren Obstruktion des Lumens führt [11].



Des Weiteren kommt es durch ein ANV zu Veränderungen im lokalen Blutfluss. Untersuchungen von postischämischen Nieren zeigten eine verminderte Dichte kleiner Blutgefäße im inneren Streifen der äußeren Medulla. Dieser Bereich des Nephrons ist schon unter physiologischen Bedingungen nur mangelhaft mit Sauerstoff versorgt und daher besonders anfällig für Hypoxie. An der Gefäßrarifizierung sind mehrere Faktoren beteiligt. Durch den ATP-Verlust kommt es nach der Reperfusion zu einer Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen, welche vor allem an den Endothelzellen der äußeren Medulla oxidative Schäden verursachen [11]. Das Ganze wird zusätzlich durch einen Shift in den vasoaktiven Substanzen verschlimmert. Statt der üblicherweise vorherrschenden Vasodilatoren kommt es zur vermehrten Bildung von Vasokonstriktoren, wie Endothelin. Dies verstärkt die lokale Hypoxie und führt zur einer weiteren Progression des ANV [13]. Durch die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen kommt es durch die Anheftung der Leukozyten zur Störung der Mikrozirkulation und zur Aggravation der Hypoxie [11].

Einen großen Anteil an der durch Ischämie bedingten Nierenschädigung hat das Immunsystem durch die vermittelte sterile Entzündungsreaktion. Das geschädigte Tubulusepithel ist beteiligt an der Produktion von proinflammatorischen und chemotaktischen Zytokinen, kostimulatorischen Molekülen, Komplementrezeptoren und der Expression von Toll-like Rezeptoren [12]. Die zuerst ankommenden neutrophilen Granulozyten führen über die Produktion von Proteasen, reaktiven Sauerstoffspezies und Zytokinen zu weiteren Tubulusschäden. In der Niere dauerhaft residente Dendritische Zellen aktivieren T-Zellen durch Antigenpräsentation und führen so zu einer adaptiven Immunantwort. Die später einwandernden Makrophagen haben dann einen entscheidenden Einfluss auf Entzündungs- und Reparaturvorgänge in der geschädigten Niere [12].

Nach der ischämisch bedingten Schädigung kommt es zu einer Erholung der Niere, mit dem Ziel einer Wiederherstellung der funktionellen Integrität der Nephrone. Die überlebenden Tubuluszellen dedifferenzieren und migrieren in die nackten Areale auf der Basalmembran, um dort zu proliferieren und die untergegangenen Zellen zu ersetzen. Anschließend differenzieren sie zu funktionsfähigen Tubuluszellen mit intaktem Zytoskelett und normaler Polarität. Obwohl eine vollständige Reparatur theoretisch möglich ist, ist dies in der Praxis nicht immer der Fall. Unvollständige Reparaturen des Tubulusapparats, persistierende Entzündungsreaktionen und die Bildung von Fibrose sind regelmäßig beobachtbare Phänomene. Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Diskutiert werden u.a. chronische Hypoxie durch den Verlust von peritubulären Gefäßen, oder eine gestörte Steuerung des Immunsystems mit der dauerhaften Aktivierung von Makrophagen. Wieso es zu dieser fehlerhaften Reparatur kommt, ist noch nicht ausreichend geklärt [12].



**Abbildung 1: Pathophysiologische Mechanismen der ischämischen akuten Tubulusnekrose**

Verursacht durch die Ischämie kommt es zu Veränderungen im Zellmetabolismus, was zur tubulären Schädigung führt. Verstärkt wird der Schaden durch Störungen im lokalen Blutfluss und durch die beteiligte Entzündungsreaktion. Bild nach [11].

## 1.2 Die chronische Niereninsuffizienz

### 1.2.1 Definition, Klassifikation, Epidemiologie und Ätiologie

Eine chronische Niereninsuffizienz liegt vor, wenn für einen Zeitraum von mehr als 3 Monaten Abweichungen von der normalen Struktur oder der normalen Funktion der Nieren, mit negativen Auswirkungen auf den Gesundheitszustand, bestehen.

**Tabelle 3: Definitionskriterien der chronischen Niereninsuffizienz** Tabelle nach [14]

<b>Persistenz eines der folgenden Kriterien für &gt; 3 Monate</b>	
<b>Marker für eine Nierenschädigung</b> (eines oder mehr)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Albuminurie (Albumin-Ausscheidung <math>\geq</math> 30 mg/24 Stunden, Urinalbumin-Kreatinin-Quotient <math>\geq</math> 30mg/g)</li> <li>- Pathologisches Urinsediment</li> <li>- Elektrolytstörungen oder andere Veränderungen durch tubuläre Funktionsstörungen</li> <li>- Pathologische Nierenstruktur detektiert durch Histologie oder Bildgebung</li> <li>- Zustand nach Nierentransplantation</li> </ul>
<b>Erniedrigte GFR</b>	<b>GFR &lt; 60 ml/min/1,73 m<sup>2</sup></b>

Im deutschen Klinikalltag wird die chronische Niereninsuffizienz nach der 2002 von der National Kidney Foundation veröffentlichten Richtlinie „*kidney disease outcomes quality initiative*“ anhand der GFR eingeteilt. 2012 wurde diese Klassifikation durch die Organisation *kidney disease: improving global outcomes* (KDIGO) erneuert. In der neuen Klassifikation enthalten sind die Angaben der Grunderkrankung, der glomerulären Filtrationsrate und der Albuminausscheidung (CGA-Klassifikation). Die glomeruläre Filtrationsrate wird in 6 Kategorien eingeteilt, wobei die Kategorie 3 der alten Klassifikation in 3a (GFR 45-59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) und 3b (GFR 30-44 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) unterteilt wurde. Die Albuminausscheidung wird in drei Kategorien angegeben: A1 < 30 mg/d, A2 30-300 mg/d, A3 >300 mg/d (A1-A3) [14].

**Tabelle 4: Stadieneinteilung der chronischen Niereninsuffizienz** Tabelle nach [15].

Stadium	Bezeichnung	GFR (ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	Aufgaben/Therapie
0	Erhöhtes Risiko für eine Niereninsuffizienz	≥ 90	Diagnostik + Prophylaxe
1	Nierenschädigung bei normaler Nierenfunktion	≥ 90	Diagnostik + Therapie der Begleiterkrankungen, Progression + kardiovaskuläres Risiko vermindern
2	Nierenschädigung mit milder Niereninsuffizienz	60-89	Wie Stadium 1
3	Mittelschwere Niereninsuffizienz	30-59	Zusätzlich Diagnostik + Therapie der Komplikationen
4	Schwere Niereninsuffizienz	15-29	Vorbereitung der Nierenersatztherapie
5	Nierenversagen	< 15	Nierenersatztherapie

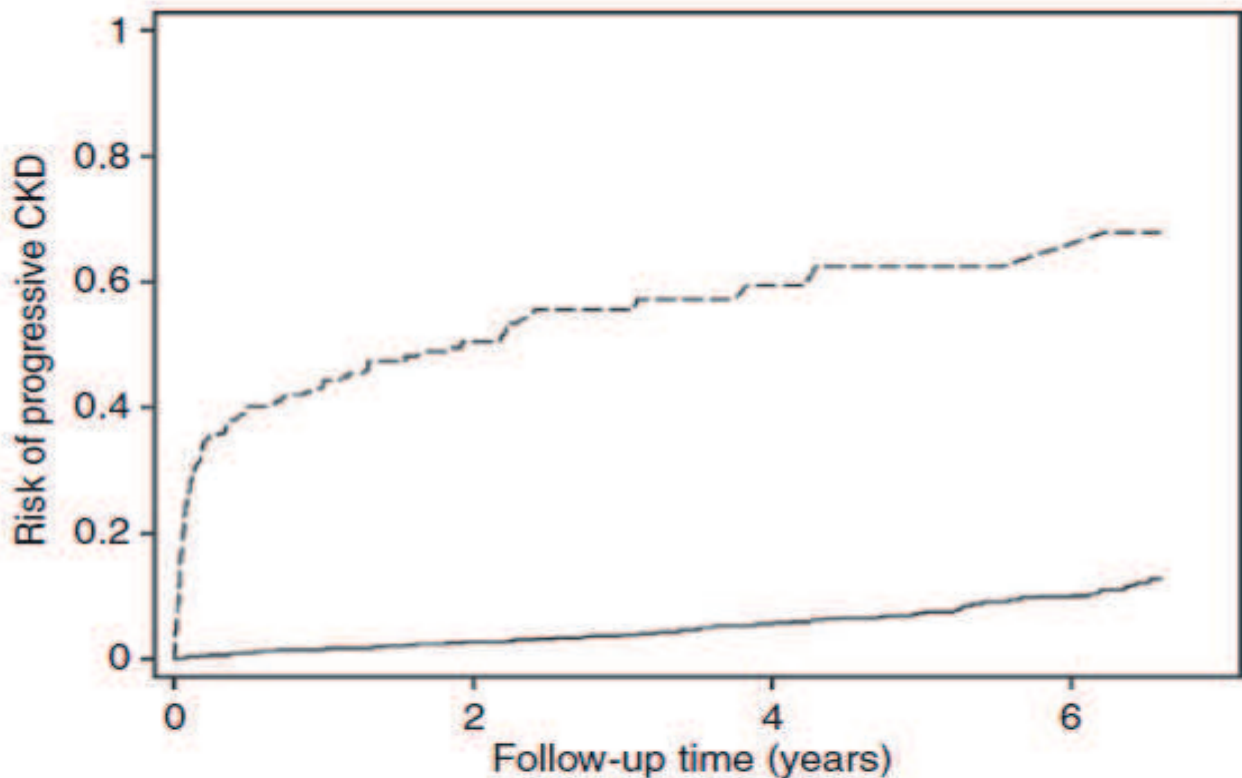
In Deutschland leben derzeit geschätzt 70.000 Patienten mit einer dialysepflichtigen, chronischen Niereninsuffizienz, wobei Inzidenz und Prävalenz dieser Erkrankung in den letzten Jahren steigend waren. Die chronische Niereninsuffizienz ist neben der Belastung für den betroffenen Patienten auch eine Belastung für die Gesellschaft. Es fallen in Deutschland jährlich ca. 3 Milliarden Euro an Behandlungskosten an. Die Therapie eines Dialysepatienten kostet 40.000 Euro pro Jahr, eine Nierentransplantation kostet bis zu 65.000 Euro. Hinzu kommt die niedrige Zahl an Spenderorganen. Zur Zeit warten ca. 8000 Patienten in Deutschland auf eine neue Niere. Die durchschnittliche Wartezeit beträgt fünf bis sechs Jahre [16]. Die chronische Nierenschädigung ist weltweit ein steigendes Problem, ca. 13 Prozent der Weltbevölkerung leiden an einer chronischen Niereninsuffizienz. Direkte Vergleiche der Prävalenzen in den einzelnen Ländern sind schwierig, da die jeweiligen Studien teilweise unterschiedliche Definitionen, Messparameter und Einschlusskriterien verwendeten. So wird die Prävalenz in den USA mit 11,5 % [17], in Australien mit 16 % [18], in China mit 2,53 % [19], in Taiwan mit 6,9 % angegeben [20].

Die führenden Ätiologien der chronischen Niereninsuffizienz sind: diabetische Nephropathie (35 %), primäre und sekundäre Glomerulonephritiden (15 %), polyzystische Nierenerkrankungen (bis 10 %), chronisch tubulo-intestitielle Erkrankungen und vaskulär hypertensive Nephropathien [15]. Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz haben ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und eine erhöhte Sterblichkeit. Die Mortalitätsrate bei dialysepflichtigen Patienten beträgt bis zu 20 % [21].

### 1.2.2 Das chronisch-auf-akute Nierenversagen

Im Idealfall kommt es nach einem ANV zu der strukturellen und funktionellen Regeneration aller Nephrone. Dieser Vorgang ist im klinischen Alltag, allein mit den funktionellen Parametern, nur schwer nachweisbar. So zeigen Patienten nach einer Nierenspende durchaus eine normale GFR, obwohl sie 50 Prozent ihrer ursprünglichen Nephrone verloren haben [22]. Da der gängige Parameter für die Nierenfunktion, das Serumkreatinin, erst ab einem Ausfall von  $\geq 50\%$  der Nephrone ansteigt, können Patienten mit wieder normalen Retentionsparametern nach einem ANV durchaus einen unbemerkten Verlust funktionstüchtiger Nephrone erlitten haben. So zeigte die mittels Cystatin C bestimmte GFR in Kindern nach einem überstandenen Hämolytisch-urämischem Syndrom, eine um ca. 10 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> niedrigere GFR im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Wurde die GFR bei den selben Kindern mittels Serumkreatinin bestimmt, zeigten sich hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. [23] Werden Patienten nach einem ANV mit normalem Serumkreatinin entlassen, ist also nicht klar, ob die Niere zu 100 Prozent geheilt ist. Unklar bleibt, ob nicht doch irreversible Schäden in der Niere zurück geblieben sind, welche später zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen können.

Lange hielt sich die Überzeugung, dass die Nierenfunktion nach einem überstandenen akuten Nierenversagen vollständig wieder hergestellt wird und dass die Patienten kaum Spätfolgen zu befürchten haben [24]. In den letzten Jahren zeigten jedoch immer mehr Studien einen Zusammenhang zwischen akutem und chronischem Nierenversagen und propagierten, dass das ANV ein unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz ist [25].



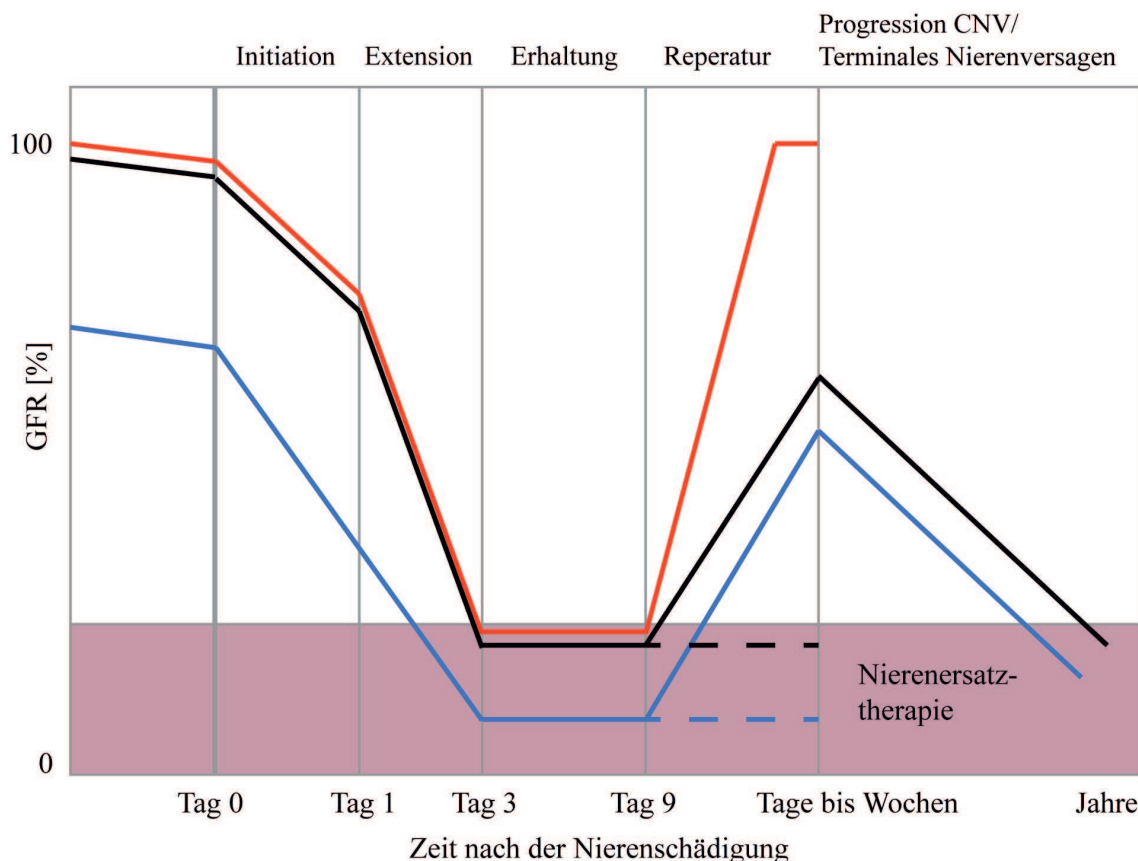
**Abbildung 2: Risiko für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz nach einem akuten Nierenversagen**

Die Kaplan-Meier Kurve zeigt das Langzeitrisiko für die Entwicklung einer progressiven Niereninsuffizienz im Stadium 4 oder höher. Patienten mit einem akuten Nierenversagen (gestrichelte Linie,) Patienten ohne akutes Nierenversagen (durchgezogene Linie). [26].

Wald et al. zeigten 2009, dass die Patienten nach einem ANV ein 3-mal höheres Risiko für die spätere Entwicklung einer dialysepflichtigen chronischen Niereninsuffizienz haben [27]. Führt das ANV bei Patienten mit zuvor normaler GFR zu einer passageren Dialysepflichtigkeit, war das Risiko für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz im Stadium 4 oder 5 nach Lo et al. 28-mal höher, als bei vergleichbaren Patienten und die Sterblichkeit war verdoppelt. Weil hier Patienten, welche innerhalb von 30 Tagen nach der akuten Schädigung ein terminales Nierenversagen entwickelten, ausgeschlossen wurden, repräsentiert diese Studie Patienten, welche nach dem ANV passager die normale Nierenfunktion wiedererlangt und im weiteren Verlauf eine chronische Niereninsuffizienz im fortgeschrittenen Stadium entwickelt haben [26]. Eine Studie an älteren Patienten zeigte, dass diese nach einem ANV eine 13-fach höhere Wahrscheinlichkeit für terminales Nierenversagen haben als vergleichbare Patienten ohne ANV. Im Falle einer präexistenten chronischen Niereninsuffizienz ist diese Wahrscheinlichkeit sogar 41-fach erhöht [28]. Ein weiterer starker Hinweis dafür, dass das ANV ein unabhängiger Risikofaktor für eine chronische Niereninsuffizienz ist,

sind die Fälle von gestörter Nierenfunktion bei Kindern, nach einem überstandenen ANV. So konnte gezeigt werden, dass nach drei bis fünf Jahren 59 Prozent der Kinder welche ein akutes Nierenversagen überlebt haben, Zeichen eines progressiven, chronischen Nierenschadens (Mikroalbuminurie, Hypertension, Hyperfiltration) aufwiesen [29].

Diese Beobachtungen erlauben ein Konzept für die möglichen unterschiedlichen Auswirkungen des ANV, auf die zukünftige Nierenfunktion des Patienten: Es kann (1) zu einer vollständigen Wiederherstellung der Nierenfunktion kommen. (2) Die Nierenfunktion regeneriert sich gar nicht, mit dem Ergebnis einer dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz. Die Nierenfunktion könnte (3) teilweise regenerieren, was im Verlauf zu der Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens führen kann. Oder (4) eine bereits vorbestehende Funktionseinschränkung kann durch das ANV verschlechtert werden [30].



**Abbildung 3: Konzept möglicher Verlaufsformen des akuten Nierenversagens**

Für einen Patienten mit ANV gibt es theoretisch, unterschiedliche Möglichkeiten bezüglich seiner zukünftigen Nierenfunktion: 1. Eine vollständige Ausheilung des Schadens mit einer Rückkehr zu einer normalen Funktion (orange Kurve). 2. Eine unvollständige Regeneration der Nierenfunktion mit der Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens im Verlauf (schwarze Kurve). 3. Die Exazerbation einer bereits vorbestehenden, chronischen Niereninsuffizienz mit progredienter Verschlechterung der Nierenfunktion (blaue Kurve). 4. Keine Erholung der Nierenfunktion und die Entwicklung eines terminalen Nierenversagens durch das ANV (gestrichelte Kurven) [30].

Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens wurden bereits fortgeschrittenes Alter, Diabetes mellitus, eine erniedrigte GFR, ein erniedrigtes Serumalbumin und die Schwere der akuten Nierenschädigung identifiziert [31].

Wie genau es durch das ANV zu der Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz kommt, ist bislang noch weitestgehend unklar. Eine mögliche Komponente im Pathomechanismus des chronisch-auf-akuten Nierenversagens ist die begleitende Entzündungsreaktion. Das ischämische ANV kann als eine entzündliche Erkrankung gesehen werden, da die begleitende Immunreaktion einen erheblichen Einfluss auf das Ausmaß der renalen Schädigung hat [32]. Die Reparaturprozesse sind nach einer akuten Nierenschädigung komplex. Das Immunsystem hat dabei einen entscheidenden Einfluss auf Zellregeneration und ist beteiligt an der Vermittlung einer fehlerhaften Reparatur [33].



### 1.3 Das Immunsystem

#### 1.3.1 Das angeborene und erworbene Immunsystem

Das Immunsystem dient dem Schutz des Körpers und besitzt für diese Aufgabe einige Fähigkeiten. Es kann potentielle Gefahren erkennen, dabei körpereigene von fremden oder geschädigten Strukturen unterscheiden und hat dann die Möglichkeiten, diese effektiv zu beseitigen. Um eine überschießende Immunreaktion zu vermeiden, hat das Immunsystem eine Reihe von Regulationsmechanismen, welche die Abwehrreaktion limitieren und so potentielle Kollateralschäden am gesunden Gewebe eingrenzen. Desweiteren schützt es den Körper mit Hilfe eines immunologischen Gedächtnisses vor wiederholten Infektionen desselben Keims. Für diese Aufgaben stehen zwei unterschiedliche Systeme zur Verfügung: ein angeborenes (unspezifisches) und ein erworbenes (spezifisches) Immunsystem. Die beiden Systeme ergänzen sich gegenseitig und gewährleisten so einen effektiven Schutz [34].

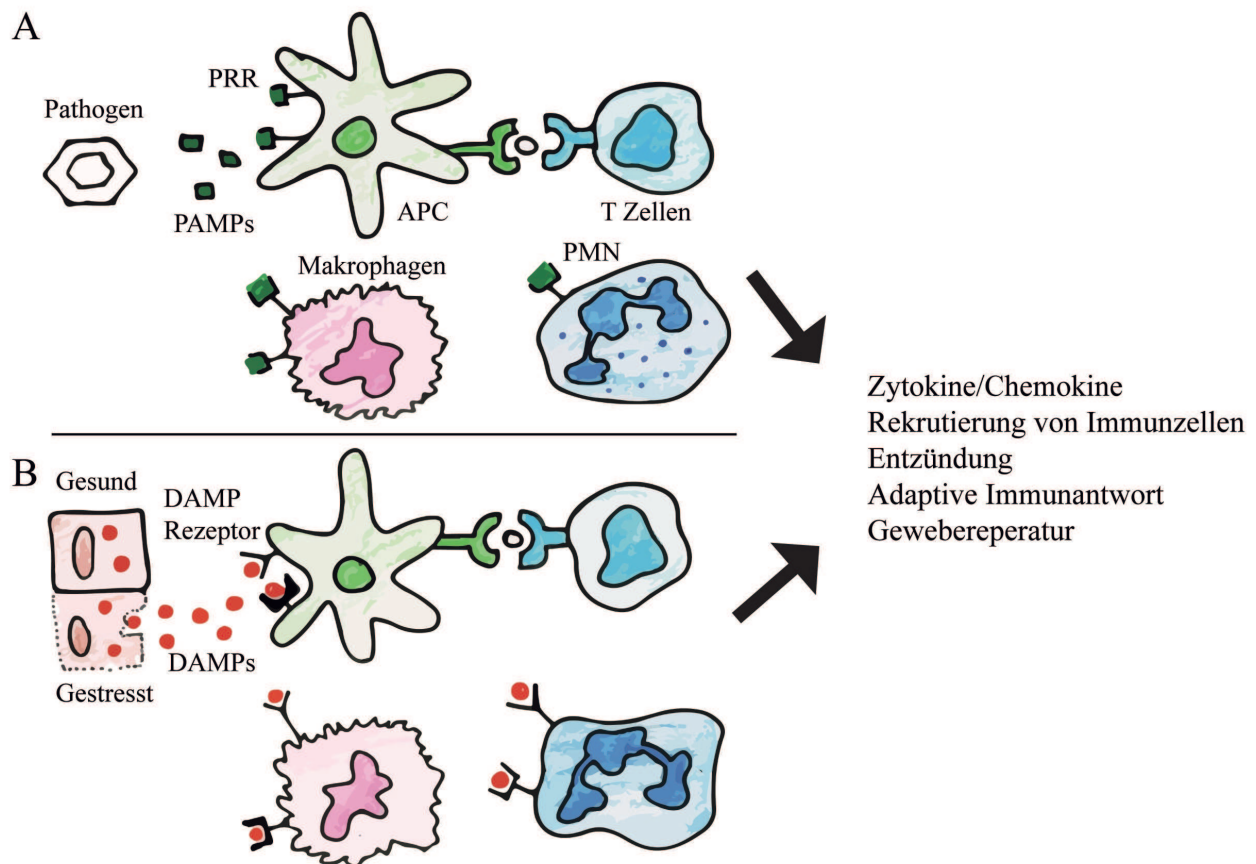
Zum angeborenen Immunsystem gehören schützende Epithelien, zirkulierende und gewebsständige Effektorzellen, sowie lösliche Faktoren. Ziel der angeborenen Immunreaktion ist es, das Eindringen von Pathogenen zu verhindern, dennoch eingedrungene Organismen zu vernichten oder so lange in Schach zu halten, bis über die Präsentation des jeweiligen Antigens eine spezifische Immunantwort gebildet werden kann. Das angeborene Immunsystem kann mit speziellen Rezeptoren typische Fremdstrukturen erkennen und eine schnelle erste Immunantwort auslösen. Es besitzt kein immunologisches Gedächtnis und reagiert auch beim Zweitkontakt mit demselben Erreger nicht stärker [35]. Zu den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems zählen unter anderen Granulozyten, Mastzellen, natürliche Killerzellen und Makrophagen. Makrophagen sind in fast allen Geweben vorhanden und reifen aus zirkulierenden Monozyten heran. Sie können Pathogene phagozytieren und abtöten. Diese Aufnahme der Pathogene führt unter anderen zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen, welche weitere Immunzellen anlocken und die lokalen Umweltbedingungen und das Ausmaß der Entzündungsreaktion beeinflussen. Außerdem können Makrophagen, über die Präsentation von pathogenen Antigenen, das erworbene Immunsystem aktivieren [34].

Das erworbene Immunsystem benötigt eine längere Zeit bis zur Immunantwort und ist dann wichtig, wenn das angeborene Immunsystem die Infektion nicht alleine bewältigen kann. Im Rahmen einer Infektion werden Krankheitserreger von Phagozyten aufgenommen und die jeweiligen Antigene den noch naiven Lymphozyten präsentiert. Dies führt zu einer klonalen Expansion Antigen-spezifischer B- und T-Zellen. Aktivierte B-Lymphozyten können zu Plasmazellen differenzieren, welche monoklonale Antikörper produzieren. Diese Antikörper binden das auslösende Antigen und führen

zur Neutralisierung und Elimination des Keims. Die aktivierten T-Zellen lassen sich grob anhand ihrer Oberflächenmarker, den *cluster of differentiation antigens* (CD-Antigene) in CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive zytotoxische T-Zellen einteilen. Zytotoxische T-Zellen können infizierte Zellen erkennen und abtöten. Die T-Helferzellen werden in unterschiedliche Subpopulationen unterteilt und können die Immunantwort weiter modulieren und verbessern. Ein Teil der aktivierten Lymphozyten entwickelt sich zu Gedächtniszellen. Dies ermöglicht bei einem erneutem Kontakt mit dem selben Antigen eine schnellere und effektivere Immunantwort durch das erworbene Immunsystem [35].

### 1.3.2 Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems

Die Zellen des angeborenen Immunsystems verwenden zur Unterscheidung zwischen eigenen und körperfremden Strukturen spezifische Mustererkennungsrezeptoren. Diese genetisch determinierten und evolutionär konservierten *pattern recognition receptors* (PRR) erkennen Strukturen, welche im menschlichen Körper nicht vorkommen, die sogenannten *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs). PAMPs sind u.a. Lipide, Lipoproteine, Proteine und Nukleinsäuren von Bakterien, Viren, Pilzen und weiteren potentiell pathogenen Organismen [36]. Wird ein PAMP durch diese Rezeptoren erkannt, kommt es zu einer schnellen Immunreaktion mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, was den Eindringling abwehrt und weitere Immunzellen angelockt. Anschließend kommt es zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems, was die endgültige Beseitigung des auslösenden Pathogens ermöglicht [37]. Neben der Identifizierung von PAMPs sind PRR auch an der Erkennung weiterer, gefahrenvermittelnder Strukturen, den *damage associated molecular patterns* (DAMPs), beteiligt. DAMPs sind körpereigene Moleküle, welche von ihrer nativen Struktur abweichen, oder sich in großem Ausmaß in einer für sie nicht physiologischen Umgebung aufhalten. So werden zum Beispiel Proteine, welche normalerweise intrazellulär lokalisiert sind, im Extrazellulärraum von PRR als DAMPs erkannt und lösen eine nicht-infektiöse Entzündungsreaktion aus [38]. DAMPs werden aus geschädigtem Gewebe unter anderem durch Zellstress, Apoptose, Ischämie, Toxine, entzündlichen Reaktionen oder bei Zellentartung freigesetzt [39].



**Abbildung 4: Reaktion des Immunsystems auf PAMPs und DAMPs**

A. Bei einer Infektion mit Pathogenen setzen diese PAMPs frei, welche durch PRR erkannt werden. Dies führt zu einer Entzündungsreaktion, mit der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems durch Antigenpräsentation.

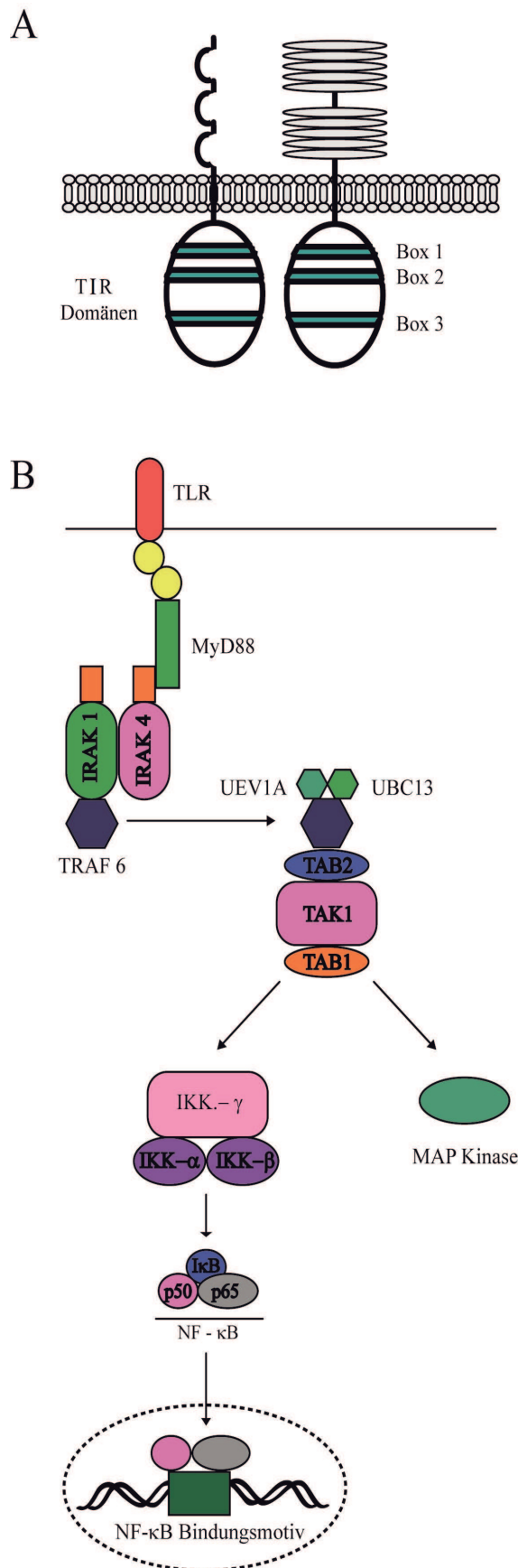
B. Die aus gestressten oder verwundeten Zellen freigesetzten DAMPs, werden im Extrazellulärraum durch die selben PRR erkannt und lösen eine nicht-infektiöse Entzündungsreaktion aus. [36].

### 1.3.3 Toll-like-Rezeptoren

Die Toll-like-Rezeptoren (TLR) gehören zu der TLR/*Interleukin-1 receptor* (IL-1R) Superfamilie und sind PRR. TLR sind Typ-1-Transmembranproteine und die Gemeinsamkeiten mit den IL-1R sind die Transmembrandomäne und die intrazelluläre *Toll-interleukin 1 receptor* (TIR) Domäne, zur Weiterleitung des Signals. Die extrazelluläre Domäne der TLR enthält Leucin-reiche Motive und unterscheidet die TLR von den IL-1R, welche extrazellulär Immunglobulin-ähnlichen Domänen besitzen.

Es sind 11 und 13 TLR im Menschen bzw. in der Maus bekannt, wobei TLR 1-9 in beiden Spezies homolog sind [39]. TLR 1/2/4/5/6/10/11/12/13 sind auf der Zelloberfläche exprimiert und erkennen hauptsächlich PAMPs von in den Körper eingefallenen Pathogenen und DAMPs. TLR 3/7/8/9 sind intrazellulär in Endosomen, Lysosomen und dem endoplasmatischen Retikulum exprimiert und erkennen hier mikrobielle DNA und RNA. TLR sind auf Immun- und Nichtimmunzellen vorhanden und ihre Expression kann unter anderen durch Pathogene, Zytokine und Zellstress verändert werden [38].

Bindet sich ein spezifischer Ligand an den TLR, kommt es vor der Signaltransmission zur Bindung an einen weiteren TLR. Diese verschiedenen Homo- oder Heterodimere lösen eine für den jeweiligen Liganden spezifische Reaktionen aus [36]. Möglich ist dies durch die Rekrutierung von unterschiedlichen Adaptermolekülen für die TIR Domäne, wie *myeloid differentiation factor 88* (MyD88), *TIR-associated protein* (TIRAP), *TIR-domain containing adaptor protein-inducing IFN- $\beta$*  (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) [38]. Die weiteren TLR-Signalwege werden grob in einen MyD88-abhängigen und einen TRIF-abhängigen Weg eingeteilt. MyD88 wird von allen TLR, außer TLR 3 verwendet und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) und von *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) und damit zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. TRIF wird zur weiteren Transduktion von TLR 3 und TLR 4 verwendet und bewirkt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und *interferon regulatory factor 3* (IRF 3), was zusätzlich Typ-1 Interferone induziert. TRAM und TIRAP helfen TLR 2 bei der Rekrutierung von MyD88 und TLR 4 bei der Rekrutierung von TRIF [36].



**Abbildung 5: Struktur der TLR und der MyD88-abhängige Signalweg**

A. TLR und IL-1R haben intrazellulär eine TIR Domäne, welche durch 3 homologe Regionen (Box 1 - 3) charakterisiert sind. Die TLR besitzen extrazellulär sich wiederholende Leucin-reiche Regionen, welche als leucin rich repeats (LRR) bezeichnet werden. Im Unterschied dazu, haben die IL-1R drei Immunglobulin-ähnliche Domänen.

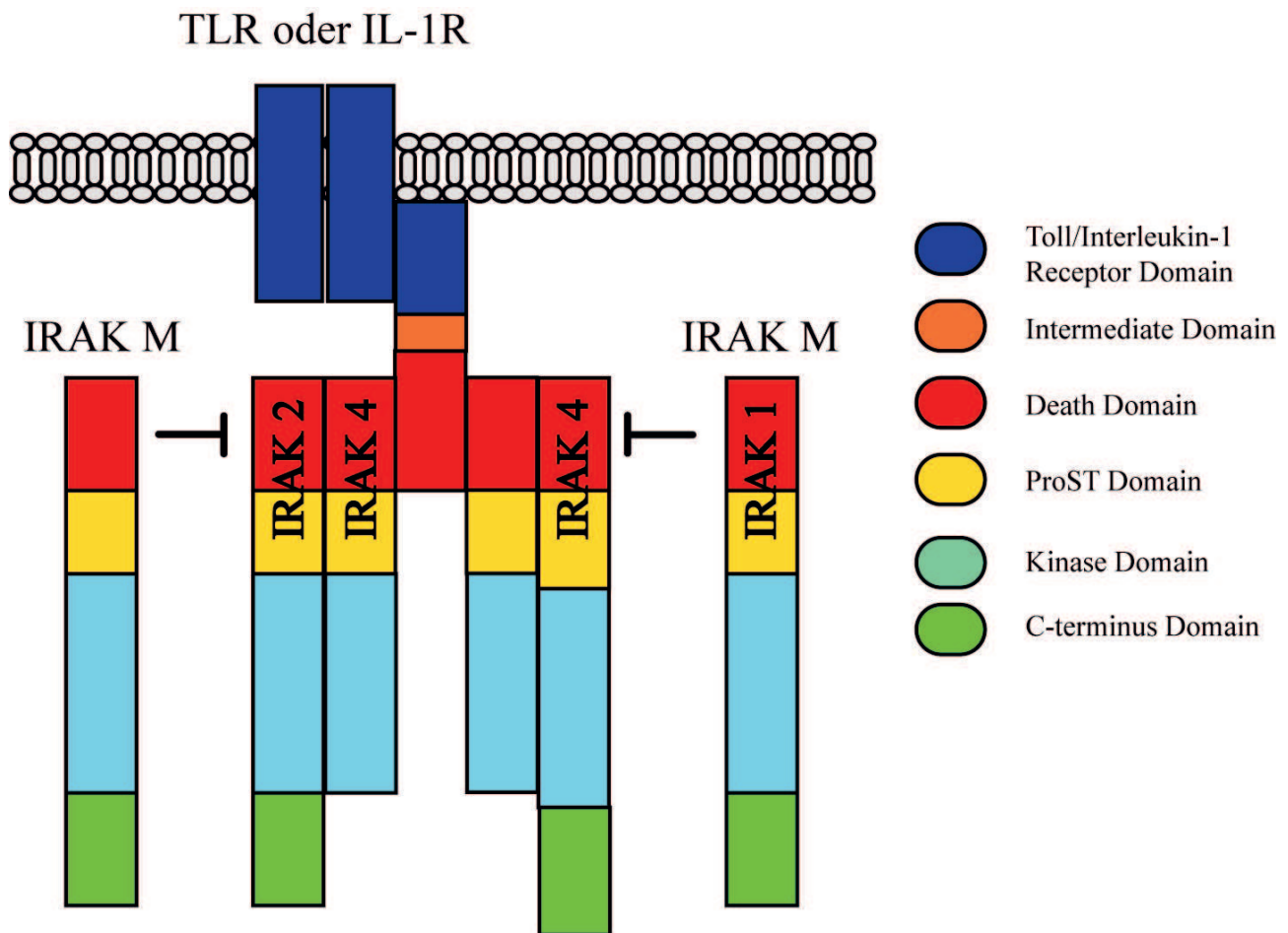
B. MyD88 hat am C-terminalen Ende eine TIR Domäne und am N-terminalen Ende eine death domain (DD). Nach Aktivierung des TLR, assoziieren die TIR Domänen des TLR und des Adaptermoleküls MyD88, was zu der Rekrutierung von *Interleukin-1 receptor associated kinase 1 und 2* (IRAK 1, 2) und *tumor necrosis factor receptor associated factor 6* (TRAF 6) führt. Es kommt zur Assoziation von IRAK 1 mit MyD88 und zur Phosphorylierung von IRAK 1 durch IRAK 4. Dadurch dissoziieren IRAK 1 und TRAF 6 vom Rezeptor ab und TRAF 6 bildet einen Komplex mit *TGF-β-activated kinase 1* (TAK1) und den *TAK1 binding proteins* TAB1 und TAB2. Nach der Anlagerung von *Ubiquitin-conjugating enzyme 13* (UBC13) und *Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1* (UEV1A) kommt es zur Aktivierung von TAK1, welche den *inhibitor of nuclear factor-κB kinase* (IKK) Komplex, bestehend aus IKK-α, IKK-β und IKK-γ, phosphoryliert. Dieser Komplex phosphoryliert dann IκB, was letztendlich zur Translokation des Transkriptionsfaktors NFκB in den Zellkern führt und die Expression der Zielgene zur Folge hat [40].

### 1.3.4 Interleukin-1 receptor associated kinase M

Um Gewebeschäden durch eine überschießende Immunreaktion verhindern zu können, muss die TLR-vermittelte Induktion von proinflammatorischen Mediatoren reguliert werden. Eines dieser negativen Regulatoren der TLR/IL-1R vermittelten Signalübertragung ist Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase M (IRAK M) [37]. Es wird auch als IRAK 3 bezeichnet und wurde 1999 erstmals charakterisiert. IRAK M gehört zu einer Familie von vier Kinasen (IRAK 1, IRAK 2, IRAK 4, IRAK M), welche an der Transduktion von TLR-Signalen durch MyD88 beteiligt sind. Das humane IRAK M-Gen liegt auf dem Chromosom 12, Position 12q14.1-12q15 und kodiert ein 68 kDa großes Protein [37]. Murines IRAK M ist ein Protein, bestehend aus 596 Aminosäuren und stimmt zu 73% mit dem humanen IRAK M überein [41]. Allen IRAKs gemeinsam ist eine N-terminale death domain (DD), welche eine Interaktion mit der DD auf MyD88 ermöglicht. Desweiteren besitzen alle IRAKs eine zentrale Serin/Threonin Kinase-Domäne bestehend aus 12 Subdomänen. Jedoch sind nur IRAK 1 und 4, durch einen katalytisch aktiven Aspartatrest in der Subdomäne VI, aktive Kinasen. IRAK 2 und IRAK M haben an dieser Stelle Asparagin und Serin und sind vermutlich dadurch inaktiv [37]. Die Expression von IRAK M im Menschen ist fast ausschließlich beschränkt auf Monozyten und Makrophagen, im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Familie, welche ubiquitär exprimiert werden. Murines IRAK M wird auch in neutrophilen Granulozyten, B-Zellen und manchen Epithelzellen exprimiert.

Die Expression von IRAK M wird beeinflusst von TLR Signalübertragungen. So führt die Aktivierung von TLR 2, 4, 5, 7 und 9 zur vermehrten Bildung von IRAK M [37].

IRAK M bindet den MyD88/IRAK 4 Komplex und verhindert die Phosphorylierung von IRAK-1 durch IRAK 4 und damit die Bildung des IRAK 1/TRAF 6-Komplexes. Dadurch wird die Signalkaskade unterbrochen und es kommt zu keiner Aktivierung von NF- $\kappa$ B [37].



**Abbildung 6: Interleukin-1 receptor associated kinase Familienmitglieder und Domänen**

MyD88 interagiert mit TLR oder IL-1R über den Kontakt der TIR-Domänen. Es kommt daraufhin zur Rekrutierung von IRAK Proteinen und zur Assoziation mit MyD88 über die *death domains*. IRAK M blockiert die Dissoziation von IRAK-1 vom Rezeptorkomplex und verhindert damit die Weiterleitung des Signals [42].

Toll-like Rezeptoren, vor allem TLR4, sind über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, an der Polarisierung von Makrophagen hin zu einem proinflammatorischen M1 Phänotyp beteiligt [43]. Ohne die IRAK M vermittelte Inhibierung von NF- $\kappa$ B, kommt es demnach vermehrt zu einem proinflammatorischen M1 Phänotyp. So produzieren IRAK M-defiziente Makrophagen, nach Stimulation mit TLR-Agonisten, im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen signifikant höhere Mengen proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  [41]. Tumorzellen induzieren in Monozyten die vermehrte Expression von IRAK M, um eine Immuntoleranz auszulösen. So zeigten Monozyten nach Kontakt mit Tumorzellen eine Hochregulation von IRAK M, was eine verminderte Expression von TNF- $\alpha$  zur Folge hatte. Dieser Effekt wurde durch die experimentell unterdrückte Expression von IRAK M, mittels *small interfering RNAs* aufgehoben [44].

**Tabelle 5: Einfluss der IRAK M Expression auf verschiedene Krankheitsphänotypen**

Tabelle nach [37]

<b>Erkrankung</b>	<b>Phänotyp assoziiert mit erhöhter IRAK M Expression</b>	<b>Phänotyp assoziiert mit erniedrigter IRAK M Expression</b>
<b>Sepsis</b>	Induktion der Endotoxintoleranz in Makrophagen und reduzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine	Erhöhte Produktion von Zytokinen und Rekrutierung von Neutrophilen in den Infektherd. Reduzierte Anfälligkeit für eine sekundäre Infektion
<b>Chronisch entzündliche Darmerkrankungen</b>		Verminderte Toleranz gegenüber der normalen Darmflora
<b>Transplant-Abstoßung</b>		Verminderte Toleranz gegenüber Hauttransplantaten
<b>Influenzainfektion</b>		Vermehrte Rekrutierung von Neutrophilen in die Lunge. Kein Effekt auf die virale Clearance
<b>Peridontale Infektion mit P. gingivalis</b>	Induktion der Endotoxintoleranz in Makrophagen und verminderte Ansprechbarkeit des Immunsystems	
<b>Tumorentwicklung</b>	Deaktivierung von Monozyten und verminderte Ansprechbarkeit des Immunsystems	Vermindert Tumorwachstum und verstärkte Immunität gegen Tumorzellen
<b>Infektionen assoziiert mit Stammzelltransplantation</b>	Verminderte Bakterielle Clearance nach akuter pulmonaler Infektion. Verminderte makrophagenvermittelte Abwehrreaktion	Wiederhergestellte bakterielle Clearance nach akuter pulmonaler Infektion. Verstärkte makrophagenvermittelte Abwehrreaktion

IRAK M deaktiviert klassisch aktivierte Makrophagen und hat dadurch einen Einfluss auf unterschiedliche, für den Organismus günstige, aber auch schädliche Prozesse. IRAK M ist unter anderem beteiligt, an der Entwicklung der Endotoxintoleranz [45], an den immunsuppressive Umweltbedingungen in Tumoren [42] und an der im Rahmen einer Sepsis auftretenden relativen Immunsuppression [46]. Außerdem limitiert IRAK M die Immunopathologie im Rahmen von Autoimmunerkrankungen [47] und der Osteoklasten-vermittelten Osteoporose [48]. Zudem vermindert IRAK M die durch eine übermäßige Immunantwort vermittelten Gewebeschäden, zum Beispiel im Rahmen einer Influenza-Infektion [49].



### 1.4 Makrophagen-Phänotypen in renaler Inflammation und Regeneration

Makrophagen sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems und können als Reaktion auf die jeweiligen Umweltfaktoren unterschiedliche Phänotypen einnehmen [43]. Sie wurden in *in vitro* Studien, anhand ihrer Eigenschaften orientierend, in klassisch-aktivierte M1 Makrophagen und alternativ-aktivierte M2 Makrophagen eingeteilt. M1 und M2 stellen die zwei Extreme des ganzen Spektrums an möglichen Aktivitätsformen darstellen [50]. Diese strenge Einteilung in M1 und M2 Makrophagen ist allerdings nicht vollständig auf die Situation *in vivo* übertragbar, da Makrophagen im Gewebe mit weitaus komplexeren Umweltbedingungen konfrontiert werden und ihr Phänotyp, abhängig von dem lokalen Umfeld, eine hohe Plastizität aufweist [51].

Der M1 Phänotyp wird durch PAMPs, DAMPs und proinflammatorische Zytokine induziert. M1 Makrophagen exprimieren hohe Level an *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), *major histocompatibility complex class II* (MHC II) und IL-1R. Sie produzieren eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine, wie IL-12, IL-23 und TNF- $\alpha$ , sowie Stickstoffmonoxide und Reaktive Sauerstoffspezies [50]. M2 Makrophagen werden unter anderen durch IL-4 und IL-13 induziert, sezernieren kaum proinflammatorische, dafür aber anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 [43] und exprimieren hohe Level an *arginase 1* (Arg 1) und *mannose receptor* (MR) [52]. Der M2 Phänotyp kann in 3 Subgruppen unterteilt werden: M2a oder *wound-healing macrophages*, M2b, M2c oder *regulatory macrophages* [53].

Im Rahmen des ANV setzen die nekrotischen Tubuluszellen DAMPs frei, welche durch die Aktivierung von TLRs, in den ankommenden Makrophagen einen proinflammatorischen M1 Phänotyp induzieren [54, 55]. Sind proinflammatorische Makrophagen in der Abwehr von Pathogenen sinnvoll, begrenzen sie jedoch im Rahmen der sterilen Entzündungsreaktion während des ANV die epitheliale Heilung und führen zu weiteren Gewebeschäden [52, 55]. Eine Blockade der Immunantwort in einer frühen Phase des ANV verhindert den Verlust von tubulären Segmenten und vermindert das Ausmaß der renalen Schädigung [56, 57]. Die während einer akuten Nierenschädigung schnell eingewanderten neutrophilen Granulozyten gehen rasch in Apoptose [58]. Durch die Phagozytose der apoptotischen Zellen kommt es zu einem Wechsel im Phänotyp der Makrophagen, weg von einem proinflammatorischen M1 Phänotyp, hin zu einem anti-inflammatorischen M2 Phänotyp. Dadurch wird die Auflösung der Entzündungsreaktion gefördert und eine Heilung vermittelt [55]. Die Polarisierung in M1 und M2 ist demnach nicht endgültig. Abhängig von den Umweltbedingungen können Makrophagen ihren Aktivitätszustand verändern und haben dadurch einen unterschiedlichen Einfluss auf das Gewebe [51]. Lee et al. injizierten proinflammatorische M1 Makrophagen in Mäu-

se mit einem ischämischen ANV und zeigten, dass die Makrophagen, welche 3 Tage nach der initialen Schädigung verabreicht wurden, einen Wechsel von M1 zu M2-typischen Markern zeigten [52].

Eine Depletion von Makrophagen vor Initiierung des ANV vermindert das Ausmaß der akuten Nierenschädigung [59, 60]. Werden Makrophagen jedoch einige Tage nach dem initialen ANV depletiert, verlängert sich die renale Schädigung, da die Wirkung der M2 Makrophagen auf die Heilung verhindert wurde [61]. Wang et al. programmierten Makrophagen *ex vivo* und injizierten diese in Mäuse mit Adriamycin-induzierter Nierenschädigung. Dabei vermittelten M1 Makrophagen einen stärkeren, funktionellen und histologischen Schaden und M2 Makrophagen wirkten protektiv auf die Nierenfunktion und Struktur [62].

Der Phänotyp der Makrophagen hat Auswirkungen auf die Regenerationsprozesse nach einem ANV und dadurch möglicherweise einen Einfluss auf die Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens. Faktoren, welche die Polarität von Makrophagen regulieren, spielen damit vermutlich eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des chronisch-auf-akuten Nierenversagens.

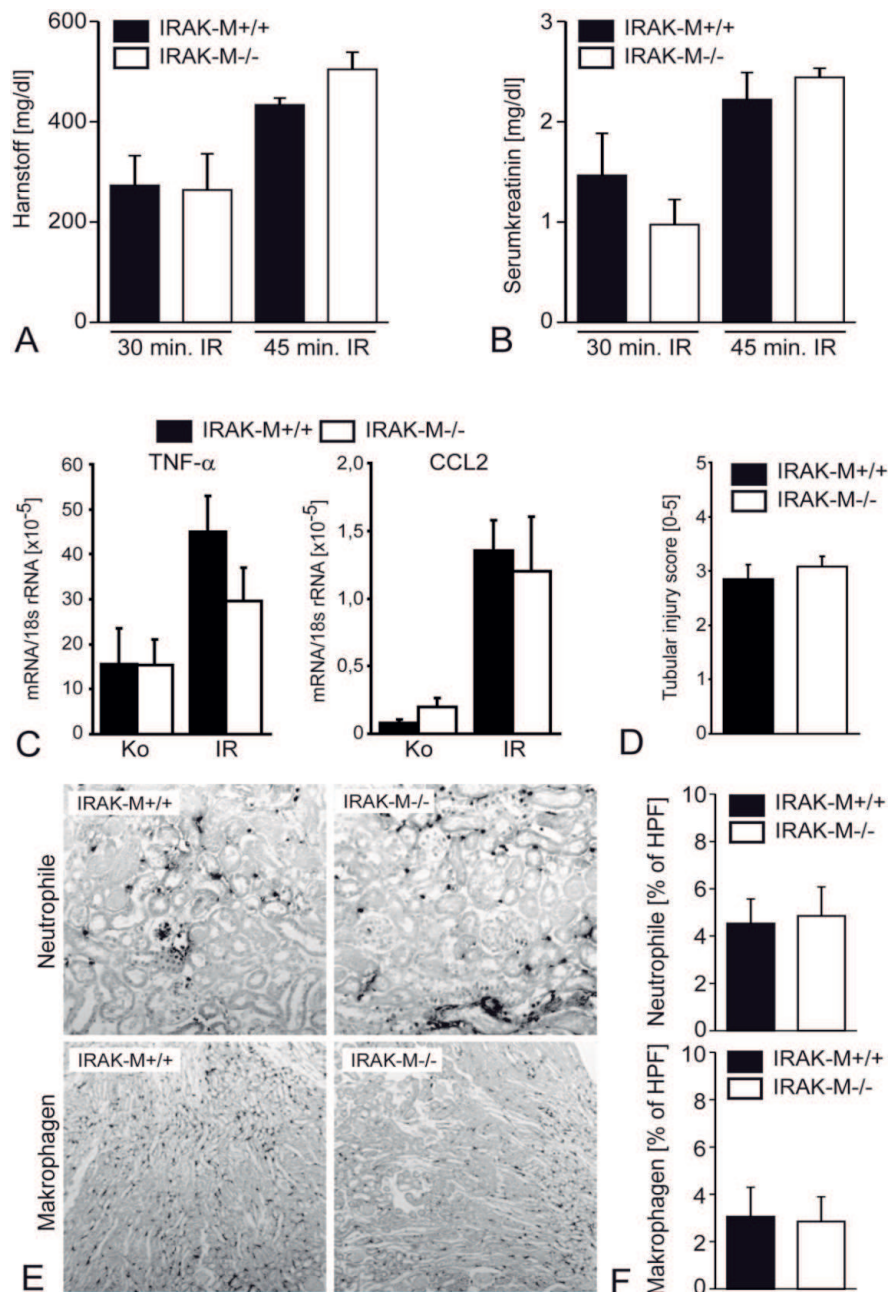
M1 Polarisierung	M2 Polarisierung
LPS + $\text{INF}\gamma$	IL-4/-13, Glukokortikoide, TGF $\beta$
Typ 1 Inflammation Tumorresistenz Zerstörung von Gewebe Abtötung intrazellulärer Parasiten	Typ II Inflammation Wiederaufbau von Gewebe Angiogenese Abkapselung von Parasiten Förderung von Tumorwachstum
IL-12 <sup>high</sup> , IL-23 <sup>high</sup> , TNF <sup>high</sup> , IL-1 <sup>high</sup> , IL-10 <sup>low</sup> M1 Chemokine (z.B. CXCL10) Reaktive Sauerstoffspezies	IL-12 <sup>low</sup> , IL-23 <sup>low</sup> , TNF <sup>low</sup> , IL-1 <sup>high</sup> , IL-10 <sup>high</sup> M2 Chemokine (z.B. CCL22) Scavenger/Mannose/Galaktose Rezeptoren

**Abbildung 7: Die Polarität von Makrophagen**

Vereinfachte Darstellung des M1 und M2 Phänotyps mit typischen Stimuli (oberste Spalte), Hauptfunktionen (mittlere Spalte) und den klassischen Markern (unterste Spalte) [63]

### 1.5 Der Einfluss von IRAK M auf das akute Nierenversagen

In Vorarbeiten zu der hier vorliegenden Doktorarbeit wurden im Labor von Herrn Prof. Anders bereits Versuche mit den IRAK M-defizienten Mäusen durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass die IRAK M-Defizienz keinen Einfluss auf die initiale Phase des akuten Nierenversagens hat. Hierfür wurde durch eine 30-minütige bzw. 45-minütige bilaterale Abklemmung der Nierengefäße in Wildtyp-Mäusen und IRAK M-defizienten Mäusen ein ischämisches ANV induziert. 24 Stunden nach der Ischämie/Reperfusion beider Nieren zeigten IRAK M-defiziente Mäuse und Wildtyp Mäuse vergleichbare Werte für Harnstoff und Serumkreatinin. Anschließend wurden die Mäuse getötet, die Nieren entnommen und untersucht. Die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse zeigten einen Tag nach der Operation morphologisch keine Unterschiede zu den auf die gleiche Weise behandelten Nieren des Wildtyps. Beide Gruppen wiesen vergleichbare Mengen an infiltrierten neutrophilen Granulozyten und Makrophagen auf und zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der tubulären Schädigung. Die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wurde von der IRAK M-Defizienz ebenfalls nicht beeinflusst. Die IRAK M-defizienten Tiere entwickelten ein ANV, welches sich in seiner phänotypischen Ausprägung nicht von dem ANV in den Wildtyp-Mäusen unterschied. Daher vermuteten wir, dass IRAK M die initiale Phase des akuten Nierenversagens nicht beeinflusst [64]. Da IRAK M an der Polarisierung von Makrophagen beteiligt ist, vermuteten wir, dass die IRAK M-Defizienz erst zu einem späteren Zeitpunkt nach dem ANV von Bedeutung ist. In der späteren Heilungsphase hat sie eine Auswirkung auf den Phänotyp und führt möglicherweise zu einem chronisch-auf-akuten Nierenversagen.



**Abbildung 8: Die IRAK M Defizienz hat keinen Einfluss auf die initiale Phase des akuten Nierenversagens**

An IRAK M-defizienten Mäusen (IRAK M<sup>-/-</sup>) und Wildtyp-Mäusen (IRAK M<sup>+/+</sup>) wurde eine bilaterale Ischämie/Reperfusion der Nieren durchgeführt. 24 Stunden nach der Operation wurde Blut entnommen und die Mäuse getötet. Mittels *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde der Gehalt an Harnsäure und Kreatinin im Serum bestimmt. Aus einem Teil der Nieren wurde mRNA isoliert und mit RT-PCR die Menge an spezifischer mRNA für TNF  $\alpha$  und CCL 2 bestimmt. Es wurden histologische Schnitte mit PAS und spezifischen Antikörpern für neutrophile Granulozyten und Makrophagen angefärbt und die Anzahl der Immunzellen sowie der Grad der Schädigung des tubulären Kompartiments bestimmt. Es zeigten sich in keiner der Untersuchungen signifikante Unterschiede zwischen IRAK M-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen.

Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM von mindestens 5 Mäusen pro Gruppe. Bilder sind repräsentative Schnitte, 100 x bzw. 200 x vergrößert.

### 1.6 Ziel des Projektes und Hypothese

Im Rahmen des akuten ischämischen Nierenversagens kommt es zur Entwicklung einer Entzündungsreaktion. Die von dem geschädigten Gewebe freigesetzten Moleküle führen zu einer Aktivierung von TLR und der Bildung von proinflammatorischen Mediatoren. Am Entzündungsprozess entscheidend beteiligt sind Makrophagen, welche ihren Phänotyp, abhängig von den lokalen Umweltbedingungen, ändern können. IRAK M ist ein negativer Regulator der MyD88-abhängigen TLR-Signalübertragung und wird hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen exprimiert. Es ergaben sich folgende Überlegungen für die vorliegende Doktorarbeit. (1) Alternativ aktivierte M2 Makrophagen sind an der Heilung im Rahmen des ANV beteiligt und tauchen erst einige Tage nach der akuten Schädigung in der Niere auf. (2) IRAK M, als ein negativer Regulator der TLR-Signalübertragung, deaktiviert proinflammatorische M1 Makrophagen. (3) IRAK M wird in der späteren Heilungsphase nach der akuten Schädigung benötigt und induziert einen Wechsel im Phänotyp der Makrophagen zu einem antiinflammatorischen M2 Typ. (4) Die IRAK M-Defizienz führt zu einem prädominant proinflammatorischen M1 Phänotyp und beeinflusst die Regeneration der Niere. (5) Durch die anhaltende Entzündungsreaktion kommt es zur Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens.

In dieser Doktorarbeit sollte nun überprüft werden, ob der Phänotyp der Makrophagen die Regenerationsphase nach einem ischämischen akuten Nierenversagen und damit die Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung beeinflusst. Die Antwort auf die Frage, welchen Einfluss Makrophagen auf die postischämische Phase nach dem ANV haben, kann zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des chronisch-auf-akuten Nierenversagens führen und dadurch einen Ansatz für neue Therapiekonzepte liefern. Desweiteren kann der Mangel an intaktem IRAK M als ein Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz identifiziert werden, um eine gezielte Prophylaxe von betroffenen Patienten zu ermöglichen. Zur Überprüfung der Hypothese wurden Tierversuche genutzt. Es wurde die unilaterale Ischämie/Reperfusion verwendet, um ein akutes ischämisches Nierenversagen in den Versuchstieren auszulösen. Um den Einfluss der Makrophagen genauer untersuchen zu können, wurden IRAK M-defiziente Mäuse mit Wildtyp-Mäusen verglichen. In einer Langzeitstudie wurde das Ausmaß der postischämischen Nierenschädigung im zeitlichen Verlauf beurteilt und die beteiligten Makrophagen genauer charakterisiert.

### **Die Hypothese für die vorliegende Dissertationsarbeit lautete daher folgendermaßen:**

IRAK M wird durch ein ischämisches Nierenversagen induziert. Es vermittelt die zur Auflösung der renalen Entzündungsreaktion benötigte Deaktivierung proinflammatorischer Makrophagen. Dieser aktive Prozess ermöglicht die strukturelle und funktionelle Wiederherstellung der Niere und hat dadurch einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens.

## **Kapitel 2**

### **Material und Methoden**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

##### **Durchflusszytometer**

FacsCalibur™

BD Bioscience, Heidelberg, D

##### **Light Cycler**

LightCycler 480

Roche, Mannheim, D

##### **Mikroskope**

Leica DM IL

Leica Microsystem, Bensheim, D

Leitz DMRBE

Leica Microsystem, Wetzlar, D

Olympus BX 61

Olympus, Hamburg, D

##### **Reaktionsgefäße**

Eppendorfgefäße 1,5ml

Eppendorf, Hamburg, D

Falcons 15ml, 50ml

TPP, Trasadingen, CH

Round-bottom tubes

BD Biosciences, California, USA

##### **Pipetten**

Multikanalpipette

Eppendorf AG, Hamburg, D

Pipetten Pipetman®

Gilson, Middleton, WI, USA

Pipettierhilfe Pipetus®-classic

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D

Pipettenspitzen Typ Gilson®

Peske, Aindling-Arnhofen, D

Pipettenspitzen epT.I.P.S

Eppendorf AG, Hamburg, D

##### **Waagen**

BP 110S

Sartorius, Göttingen, D

Mettler PJ 3000 Mettler

Toledo, Gießen, D

##### **Zellkultur und -inkubator**

Heracell 150 Heraeus

Sepatech, Osterode, D

Inkubator

Memmert GmbH, Schwabach, D

Steril Card Hood CII, Typ A/B3

Baker Company, Sanford, Maine, USA

Typ B5060 EC-CO 2

Heraeus Sepatech, Osterode, D

UV-Licht

Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D



### Zentrifugen

Centrifuge 5418

Eppendorf, Hamburg, D

Megafuge 1.0 R

Heraeus Sepatech, Osterode, D

### Sonstiges

96 well Platten Lightcycler

Sarstedt, Nümbrecht, D

BD Falcon Cell Strainer 70 µm Nylon

BD Biosciences, Erembodegem, B

BD Microlance™ 19, 26, 30 G

Becton Dickinson S.A., Madrid, E

BD Plastipak™ Spritzen 1, 2, 5 ml

Becton Dickinson S.A., Madrid, E

Handschuhe Reha-soft® satin

Hartmann, Heidenheim, D

Homogenisator

Ultra Turrax T25 IKA GmbH, Staufen, D

Klebefolie, optisch klar

Sarstedt, Nümbrecht, D

NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D

Roller Mixer SRT6

Bibby Scientific, Stone, UK

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg, D

Vortex Genie 2 TM

Scientific Industries, Bohemia, USA

Wasserbad HI 1210

Leica Microsystems, Solms, D

Zellkulturschalen 10cm

TPP, Trasadingen, CH

### 2.1.2 Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS)

Bio-Rad, München, D

Bovines Serum Albumin

Roche Diagnostics, Mannheim, D

C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>

Merck, Darmstadt, D

CaCl<sub>2</sub>

Merck, Darmstadt, D

D-Glukose

Merck, Darmstadt, D

DMSO

Merck, Darmstadt, D

EDTA

Calbiochem, SanDiego, USA

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %

Merck, Darmstadt, D

HCl (5N)

Merck, Darmstadt, D

KCl

Merck, Darmstadt, D

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Merck, Darmstadt, D

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

Merck, Darmstadt, D

MgSO<sub>4</sub>·

7H<sub>2</sub>O Merck, Darmstadt, D

NaCl

Merck, Darmstadt, D

NaHCO<sub>3</sub>

Merck, Darmstadt, D

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, D
NaN <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe, D
NiCl	Sigma, Deisenhofen, D

### 2.1.3 Tierhaltung und Tierversuche

#### Mäuse

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld, D
IRAK M -/- Knockout Mäuse	Richard A. Flavell, Yale University School of Medicine, New Haven, USA

#### Operation

100 Series Vaporizer for Forene	Smiths Medical PM, Inc., Norwell, USA
Anatomische Pinzette	Medicon, Tuttlingen, D
Forene® 100% Isofluran	Abbott, Baar, CH
Nadelhalter	Medicon, Tuttlingen, D
Präparierschere	Medicon, Tuttlingen, D
Präparierpinzette	Medicon, Tuttlingen, D
Skalpell	pfm medical ag, Köln, D
Sterile Mullkompressen 5x5cm	NOBA Verbandmittel, Wetter, D
Temperature control unit HB 101/2	Panlab Bioresearch, Barcelona, ES
Vicryl, Polyglactin 910, PS-2 19 mm	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, D
Yasargil Aneurysm Clip	Medicon, Tuttlingen, D
Yasargil Clip Applying Forceps	Medicon, Tuttlingen, D

#### Narkosemix

10 ml	5 mg/ml Midazolam	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
2 ml	0,05 mg/ml Fentanyl Janssen	Janssen-Cilag, Neuss, D
1 ml	1 mg/ml Dorbene vet.	Pfizer GmbH, Berlin, D

#### Antagonistenmix

5 ml	0,1 mg/kg Flumazenil	Hameln pharma plus GmbH, Hameln, D
3 ml	0,4 mg/ml Naloxon Inresa	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, D
0,5 ml	5 mg/ml Revertor	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, D

#### Intervention mit Eternercept

Etanercept (Enbrel®), 50mg/ml	Wyeth Pharma Madison, NL
-------------------------------	--------------------------

### 2.1.4 Zellkultur

6-well-Platte	Costar Corning, Schiphol-Rijk, NL
DMEM-Medium	GIBCO-Invitrogen, Karlsruhe, D
DNase (Type IV) 15.000 U/6 mg	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, D
HBSS-Medium	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Hydrokortison	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
I-T-SS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Kollagenase	Worthington Biochemical, Lakewood, USA
Kollagen Typ IV	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Makrophagenlinie J774 (Mφ) cell linie	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
PGE-1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
T3	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Ultra Pure LPS	Invitrogen, Toulouse, F
Zellkulturflaschen	BD, Biosciences, Heidelberg, D

### Zellisolation

CD 11b MikroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
CD 11c MikroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS-Micro-Beads-Magnet	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS Pre-Separation Filters	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

*Kollagenase-Lösung:*

10 mg Kollagenase, 10 ml 1x HBSS

*10x-PBS:*

80,0g NaCl; 11,6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,0g KCl  
in 1 l Wasser, pH 7

*MACS Puffer:*

1xPBS, 0.5 % BSA, 2 mM EDTA, pH 7.2

*HBSS/HEPES-Medium:*

HBSS, 10mM HEPES, 1% PS

*Hormonmischung:*

100ml HBSS/HEPES, 0,12 U/ml I-T-SS, 1,25ng/ml  
PGE-1, 3,4pg/ml T3, 18ng/ml Hydrokortison, steril  
gefiltriert

*K1-Medium:* 450ml DMEM, 12,5ml 1M HEPES (pH7,55), 50ml FCS (10%), 5ml Hormonmischung, 1ml EGF (20-25ng/ml)

*RPMI-Medium:* RPMI, 10% FCS, 1% PS

### 2.1.5 Histologie

ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, CA, USA
Antigen Unmasking Solution	Vector, Burlingame, CA, USA
Avidin	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotin	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotiniliierter Sekundär-Antikörper	Vector, Burlingame, CA, USA
DAB	Sigma, Deisenhofen, D
Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Formalin	Merck, Darmstadt, D
Histosette I, Einbettkassetten	Simport, Beloeil, Canada
Methanol	Sigma, Deisenhofen, D
Methylgrün-Färbelösung	Fluka/Sigma, Deisenhofen, D
Mounting Medium Vecta Mount	Vector, Burlingame, CA, USA
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Parafin	Sigma, Deisenhofen, D
Schneidgerät	Jung CM 3000 Leica, Solms, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D

### Masson-Goldner-Trichrom

Masson-Goldner-Trichorm-Färbekit	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
----------------------------------	---------------------------------------

### Verwendete Primär-Antikörper

rat anti-mouse F4/80-Antikörper	Serotec, Oxford, U.K.
rat anti-mouse Lectin-Antikörper	Vector, Burlingame, CA, USA
rat anti-mouse SMA-Antikörper	Dako, Hamburg, D

## 2.1.6 Molekularbiologie

### RNA-Isolation

PureLink™ RNA Mini Kit	Ambion Life Technologies GmbH Darmstadt, D
RNase Free	Gene choice, Pelican life science, USA
RNAlater	Ambion® Life Technologies GmbH Darmstadt,D
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D

### cDNA Herstellung

#### *cDNA Mastermix für 1 Probe*

1 µl	0,1 M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, D
0,215 µl	Hexanucleotidemischung, 10x Konzentriert	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
4 µl	5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
0,25 µl	5 g/ml linear Acrylamide	Ambion, Darmstadt, D
0,4 µl	25 mM dNTPs	Fermentas, St.-Leon-Rot, D
0,5 µl	40 U/µl rRNasin	Promega, Mannheim, D
0,435 µl	Superscript II reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D

### Real-time q-PCR

#### *SYBRgreen-Mix 10ml*

2 ml	10x Taq Puffer ohne Detergenzien	Fermentas, St. Leon-Rot, D
150 µl	25mM dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, D
4 ml	PCR Optimicer	Bitop AG, Witten, D
200 µl	20 mg/ml BSA	Fermentas, St. Leon-Rot, D
40 µl	SYBRgreen I (1:100; 20% DMSO)	Fluka, Sigma-Aldrich, München, D.
2,4 ml	25 mM MgCl <sub>2</sub>	Fermentas, St. Leon-Rot, D
1210 µl	RNase-freies Wasser	

#### *Mastermix pro well*

10 µl	SyBrGreen-Mix	
0,6 µl	10 pmol/µl Reverse-Primer	Metabion, Martinsried, D
0,6 µl	10 pmol/µl Forward-Primer	Metabion, Martinsried, D
0,16 µl	Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt, D

Primer		Metabion, Martinstried, D
Gen	Sequenz	
18 S	Forward-Primer	5' GCAATTATTCCCCATGAACG 3'
	Reverse-Primer	5' AGGGCCTCACTAAACCATCC 3'
Arginase 1	Forward-Primer	5' AGAGATTATCGGAGCGCCTT 3'
	Reverse-Primer	5' TTTTTCAGCAGACCAGCTT 3'
CCL 2	Forward-Primer	5' CCTGCTGTTACAGTTGCC 3'
	Reverse-Primer	5' ATTGGGATCATCTTGCTGGT 3'
Collagen 1a1	Forward-Primer	5' ACATGTTTACGCTTTGTGGACC 3'
	Reverse-Primer	5' TAGGCCATTGTGTATGCAGC 3'
Collagen 4a1	Forward-Primer	5' GTCTGGCTTCTGCTGCTCTT 3'
	Reverse-Primer	5' CACATTTTCCACAGCCAGAG 3'
CTGF	Forward-Primer	5' AGCTGACCTGGAGGAAAACA 3'
	Reverse-Primer	5' CCGCAGAACTTAGCCCTGTA 3'
CXCL10	Forward-Primer	5' GGCTGGTCACCTTTCAGAAG 3'
	Reverse-Primer	5' ATGGATGGACAGCAGAGAGC 3'
E-Cadherin	Forward-Primer	5' GAGGTCTACACCTTCCCGGT 3'
	Reverse-Primer	5' CCACTTTGAATCGGGAGTCT 3'
Fibronectin	Forward-Primer	5' GGAGTGGCACTGTCAACCTC 3'
	Reverse-Primer	5' ACTGGATGGGGTGGGAAT 3'
FSP 1	Forward-Primer	5' CAGCACTTCCTCTCTCTGG 3'
	Reverse-Primer	5' TTTGTGGAAGGTGGACACAA 3'
iNOS	Forward-Primer	5' TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG 3'
	Reverse-Primer	5' TGAAGAAAACCCCTTGTGCT 3'
IL-10	Forward-Primer	5' ATCGATTTCTCCCCTGTGAA 3'
	Reverse-Primer	5' TGTCAAATTCATTCATGGCCT 3'
IL-12	Forward-Primer	5' CTAGACAAGGGCATGCTGGT 3'
	Reverse-Primer	5' GCTTCTCCACAGGAGGTTT 3'
IRAK M	Forward-Primer	5' CACTGCTGGGAGAGCTTTG 3'
	Reverse-Primer	5' CCAGCCAGCTGTTTGAAAGT 3'
Laminin	Forward-Primer	5' CATGTGCTGCCTAAGGATGA 3'
	Reverse-Primer	5' TCAGCTTGTAGGAGATGCCA 3'
MR	Forward-Primer	5' TTGTGGTGAGCTGAAAGGTG 3'
	Reverse-Primer	5' GTGGATTGTCTTGTGGAGCA 3'
NGAL	Forward-Primer	5' ATTTCCCAGAGTGAAGTGGC 3'
	Reverse-Primer	5' AATGRCACCTCCATCCTGGT 3'
TGF $\beta$	Forward-Primer	5' GGAGAGCCCTGGATACCAAC 3'
	Reverse-Primer	5' CAACCCAGGTCCTTCCTAAA 3'
TNF $\alpha$	Forward-Primer	5' CCACCACGCTCTTCTGTCTAC 3'
	Reverse-Primer	5' AGGGTCTGGGCCATAGAACT 3'

### 2.1.7 Durchflusszytometrie

<i>Kollagenase/DNase Lösung:</i>	10 mg Kollagenase, 1 ml DNase, 9 ml 1x HBSS
<i>FACS-Puffer:</i>	500 ml D-PBS, 1 g BSA (0,2 %), 0,5 g NaN <sub>3</sub> (0,1 %)
<i>Paris-Puffer :</i>	20 mM Tris, 125 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> , 5 mM D-Glukose pH 7,4, in 1 Liter Wasser
BD Pharmingen FITC BrdU Flow Kit	BD Pharmingen, Heidelberg, D

#### Verwendete Antikörper

Anti-mouse CD11b-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD45-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse Ly6C-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse MHCII-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse TNF-APC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse E-Cadherin-APC	BD Pharmingen, Heidelberg, D



## **2.2 Methoden**

### **2.1.1 Tierexperimentelle Methoden**

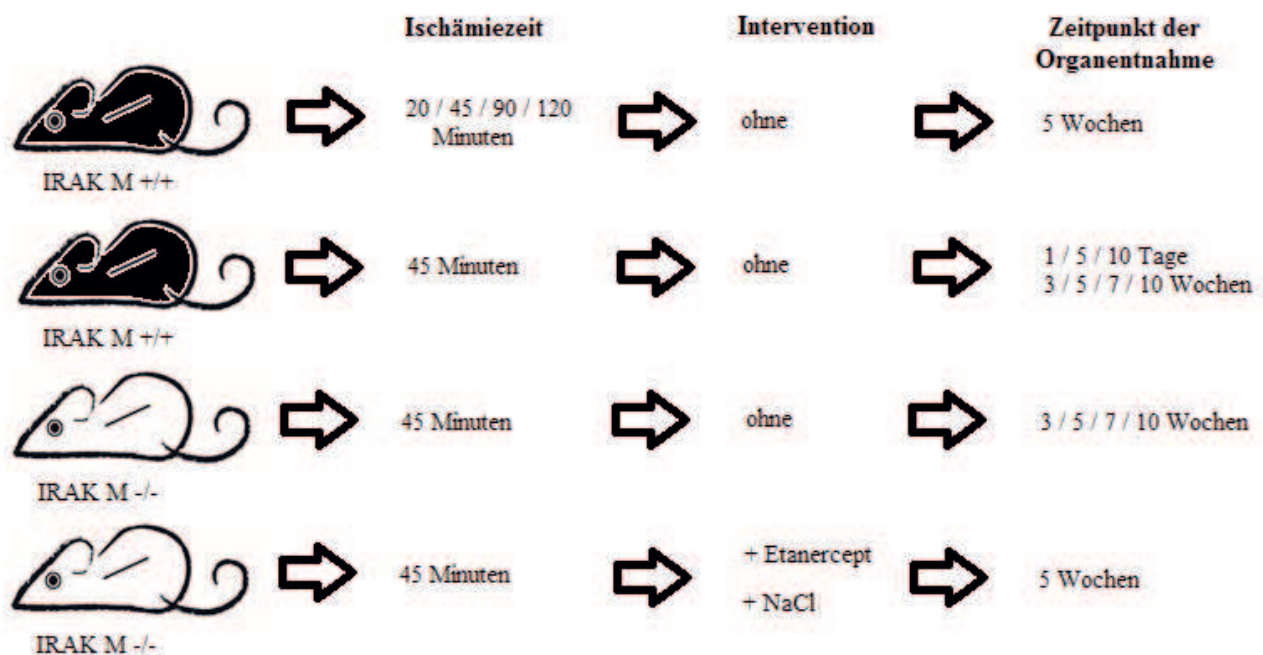
#### **Tierzucht und Haltung**

Für die Experimente wurden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (IRAK M +/+) und Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase M (IRAK M)-defiziente Mäuse (IRAK M -/-) im selben genetischen Hintergrund verwendet. Die Zucht der IRAK M-defizienten Mäuse erfolgte aus homozygoten Anlagenträgern in sterilen Käfigen vom Typ Makrolon IIR mit Filterdeckel. Eine Genotypisierung der Jungtiere war deshalb nicht mehr nötig. Die Jungtiere wurden im Alter von 21 Tagen abgesetzt und nach Geschlecht getrennt in Gruppen von maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung und waren einem konstanten, 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt. Die verwendeten Käfige, Einstreu, Futter, Nestwatte und das Wasser wurden regelmäßig gewechselt und vor Gebrauch durch Autoklavieren steril gemacht. Die Operation der Tiere erfolgte im Alter von 6 bis 8 Wochen. Alle Tierexperimente wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes und mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt.

#### **Unilaterale Abklemmung der Nierengefäße**

Die unilaterale Abklemmung der Nierengefäße führte in der operierten Niere, durch eine temporäre Ischämie und die anschließende Reperfusion, zu einem ANV. Die kontralaterale Niere wurde nicht manipuliert. Für die Durchführung der unilateralen Ischämie/Reperfusion wurde der Maus intraperitoneal im unteren rechten Quadranten in einem 30-45° Winkel der Narkosemix injiziert. Abhängig vom Körpergewicht wurden 150 bis 200 µl verwendet. Anschließend wurde sie mit der linken Körperhälfte nach oben zeigend, seitlich auf die vorgewärmte Heizplatte unter einer Infrarotwärmelampe gelegt. Ein rektales Thermometer wurde zur Überwachung der Körpertemperatur befestigt. Die Temperatur wurde auf ihrem jeweiligen Ausgangswert vor Beginn der OP (zwischen 35 und 37 °C) gehalten. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern wurden diese mit Bepanthenalbe bedeckt. Für den Flankenschnitt wurden zunächst die Haare über der Schnittstelle mit steriler Flüssigkeit auseinander gestrichen und anschließend die Haut und die Körperhöhle mit einem 1 cm langen Schnitt eröffnet. Nachdem die Niere durch stumpfe Präparation freigelegt wurde, wurden die Nierengefäße mit dem Aneurysma Clip abgeklemmt. Die erfolgreiche Unterbindung des renalen Blutflusses wurde daraufhin durch eine weißliche Verfärbung der Niere sichtbar. Die operierte Niere wurde anschließend mit einem Tupfer bedeckt, welcher in sterilem NaCl getränkt wurde. Nach der vorgesehenen Ischämiezeit wurde der Clip entfernt. Färbte sich die

Niere nach Entfernen des Clips rot, war dies ein Zeichen für eine sichere Reperfusion und die Niere wurde zurück in die Körperhöhle geschoben. Bauchfell und Haut wurden zusammen in Einzelknopftechnik mit 2 bis 3 Stichen vernäht. Abschließend wurde der Maus 250 µl des Antagonistenmix subkutan gespritzt. Sie wurde in einem Käfig für 1 Stunde unter der Infrarotwärmelampe zur Beobachtung gesetzt und anschließend zurück in die normale Stallhaltung gebracht. Nach der für das jeweilige Experiment vorgesehenen Reperfusionszeit wurden die Tiere getötet und beide Nieren für weitere Analysen entnommen.



**Abbildung 9: Versuchsaufbau und Operations-Plan für die Experimente mit unilateraler Ischämie/Reperfusion**

Die unilaterale Abklemmung der Nierengefäße wurde mit unterschiedlichen Ischämie- und Reperfusionszeiten durchgeführt. Ein Teil der Wildtyp-Mäuse (IRAK M +/+) wurde mit jeweils unterschiedlicher Ischämiezeit (20 / 45 / 90 / 120 Minuten) operiert und nach einer konstanten Reperfusionszeit von 5 Wochen getötet. Ein weiterer Teil der Wildtyp-Mäuse wurde mit einer konstanten Ischämiezeit von 45 Minuten operiert und jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation (1 / 5 / 10 Tage; 3 / 5 / 7 / 10 Wochen) getötet. Die IRAK M-defizienten Mäuse (IRAK M -/-) wurden stets mit einer konstanten Ischämiezeit von 45 Minuten operiert. Sie wurden 3, 5, 7 und 10 Wochen nach der unilateralen Ischämie/Reperfusion getötet und die Nieren für nachfolgende Experimente entnommen. Für das Teilerperiment mit Intervention, wurden die Mäuse ab dem fünften postoperativen Tag dreimal pro Woche, mit Etanercept oder NaCl behandelt und die Nieren nach 5 Wochen Reperfusion entnommen.

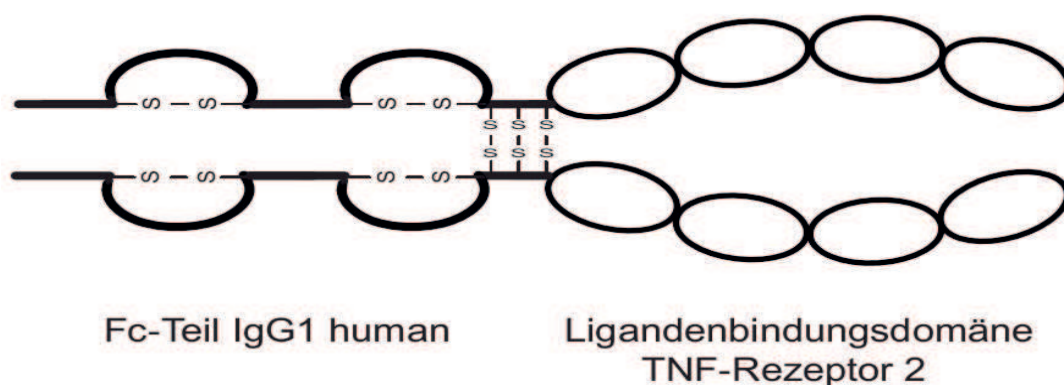
### Sham-Operation

Die Maus wurde durch eine intraperitoneale Injektion des Narkosemix, wie oben beschrieben, narkotisiert und gelagert. Im Gegensatz zur Ischämie/Reperfusions-Operation wurde nur die Haut mit einem 1 cm langen Schnitt eingeschnitten, die Körperhöhle selbst blieb geschlossen und die Niere wurde nicht manipuliert. Nach 45 Minuten wurde der Hautschnitt mit 2 Einzelknöpfen vernäht. Der Maus wurden 250 µl des Antagonistenmix subkutan injiziert. Sie wurde für eine Stunde in einem Käfig unter einer Wärmelampe beobachtet und anschließend in den Stall zurückgebracht. Die Sham-Operation diente als Kontrolle, um mögliche Auswirkungen der Operationsbedingungen und der Narkose auf die Nierenfunktion ausschließen zu können.

### Behandlung der operierten Mäuse mit Etanercept

Etanercept ist ein humanes Tumornekrosefaktor-Rezeptor-p75-Fc-Fusionsprotein. Es ist ein gentechnisch hergestelltes Dimer, bestehend aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des humanen Tumornekrosefaktor-Rezeptors-2 (TNFR2/p75) und der Fc-Domäne des humanen IgG1. Etanercept besteht aus 934 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ca. 150 Kilodalton. Die spezifische Aktivität von Etanercept beträgt  $1,7 \times 10^6$  Einheiten/mg. Durch seine höhere Affinität bindet das lösliche Etanercept freies TNF- $\alpha$ , bevor dieses an den biologisch wirksamen membranständigen Rezeptoren seine stark proinflammatorischen und zytotoxischen Effekte auslösen kann [65].

Die IRAK M-defizienten Mäuse wurden, wie beschrieben, einer unilateralen Ischämie/Reperfusion für 45 Minuten unterzogen. Ab dem fünften Tag nach der OP wurde der Therapiegruppe 3-mal pro Woche, 10 mg/kg Etanercept und der Kontrollgruppe 100 µl NaCl intraperitoneal verabreicht. Nach 5 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Nieren ausgewertet.



**Abbildung 10: Molekulare Struktur von Etanercept. Nach [66].**

### **Organentnahme und Probenverarbeitung**

Die Mäuse wurden mit Isofluran in Kurznarkose gesetzt und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet. Beide Nieren wurden nach einer medialen Laparotomie entfernt, sofort entkapselt und in 3 Teile geteilt. Der mittlere Teil wurde für histologische Färbungen in eine Histokassette gegeben und für 24 Stunden in 4 % Formalinlösung gelegt. Der obere Pol jeder Niere wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit RNAlater gegeben und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Der Rest wurde in Stickstoff schockgefroren und auf -80°C gelagert.

Die Entnahme weiterer Organe, zur Analyse der Gesamt-RNA, erfolgte in gleicher Weise. Den getöteten Tieren wurde Milz, Thymus, Gehirn, Lunge, Herz, Leber, Darm, Harnblase, Hoden, Muskelgewebe, Haut und Lymphknoten entnommen und in RNAlater bei -20°C zur Weiterverarbeitung gelagert.

Für die Experimente zur Zellisolation und für die Durchflusszytometrie wurden die Nieren nach Entnahme auf Eis gelegt und wie nachfolgend beschrieben weiterbehandelt.

### **2.1.2 Zellkultur**

#### **Allgemeine Bedingungen**

Die für die Experimente verwendeten Zellen wurden in einem Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft von 5% kultiviert. Die Bearbeitung der Zellkulturen erfolgte ausschließlich unter sterilen Bedingungen, in der speziell dafür vorgesehenen Arbeitsbank. Diese Sterilbank verfügt über einen Filter, um eine keimfreie Arbeitsatmosphäre zu gewährleisten und wurde vor Arbeitsbeginn mit UV-Licht bestrahlt. Alle unter der Bank verwendeten Gegenstände wurden desinfiziert bzw. vor Gebrauch autoklaviert.

#### **Isolation von Zellen mit MACS-Beads**

Mit dem *MACS cell separation system* können Zellen durch ihre Oberflächenantigene mittels Antigen-Antikörper-Bindung isoliert werden. An das gesuchte Antigen wird ein komplementärer Antikörper mit einem angekoppelten magnetischen Partikel, die *MACS MicroBeads*, gebunden. Die magnetisierten Zellen werden daraufhin, in einer sich in einem Magnetfeld befindlichen Säule, von den unmarkierten Zellen getrennt [67].

Zunächst wurden Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Nieren entnommen, entkapselt und zum Verdauen in 2 ml Kollagenaselösung gelegt. Die Nieren wurden darin zerkleinert und für 30 Minuten bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator gelagert. Nach einer manuellen Homogenisierung der verbliebenen, größeren Stücke, wurden die Nieren erneut für 15 Minuten

verdaut und durch einen zuvor angefeuchteten 100 µl Filter in ein 50 ml Falcon gedrückt. Der Filter wurde mit MACS Puffer nachgespült, um sämtliche Zellen in das Falcon zu waschen. Anschließend wurde zentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm, 4°C) und der Überstand verworfen. Nach Zugabe von 20µl CD11c *MikroBeads* wurde die Zellsuspension unter langsamen rollen, bei 4°C, unter Ausschluss von Licht, für 20 Minuten inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm, 4°C) und der Überstand verworfen. Auf die Säule des magnetischen Separators wurde währenddessen ein 30µl Filter gesetzt und mit 3 ml MACS Puffer befeuchtet. Das zentrifugierte Pellet wurde in 300 µl MACS Puffer resuspendiert und auf die vorbereitete Säule gegeben. Die Zellsuspension lief ohne mechanischen Druck durch die Säulen und wurde mit 3 x 3 ml MACS Puffer gewaschen. Die durchgelaufene Flüssigkeit, mit den darin enthaltenen CD11c- Zellen, wurde zentrifugiert (5 Minuten, 1200 rpm, 4°C), mit CD11b *MikroBeads*, wie vorher beschrieben, inkubiert und auf die Säule aufgetragen. Diese durchgelaufene Flüssigkeit wurde erneut für 5 Minuten bei 1200 rpm auf 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die gewonnenen Zellen wurden in 350µl Lysis Puffer mit β-ME resuspendiert. Die Säulen mit den gebundenen Zellen wurden aus den Halterungen des magnetischen Separators genommen, in ein neues Falkons gesetzt und die darin gefangenen Zellen mit 3 ml MACS Puffer eluiert.

Durch diesen Isolationsprozess wurden 3 Zellpopulationen gewonnen:

1. CD11b+/CD11c- Zellen
2. CD11b-/CD11c-Zellen
3. CD11c+ Zellen

Für die Stimulationsexperimente wurden die isolierten CD11b+/CD11c- und CD11b-/CD11c- Zellen, zentrifugiert (5 Min., 1200 rpm. 4°C), der Überstand verworfen und das Pellet in RPMI-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend über Nacht auf 6-*well*-Platten bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator kultiviert und anschließend stimuliert.

Für die Quantifizierung der mRNA wurden die Zellen nach Zentrifugation (5 Min., 1200 rpm, 4°C) und Verwurf des Überstands in 350µl Lysis Puffer mit β-ME resuspendiert und auf -20°C bis zur Isolation der RNA gelagert.

### **Isolation von primären Tubulusepithelzellen**

Zuerst wurden 6-*well*-Platten mit 6 µg/cm<sup>2</sup> in PBS gelöstem Kollagen inkubiert, um eine Beschichtung der Platten zu erreichen. Die überstehende Flüssigkeit wurde nach 4 Stunden wieder entfernt. Die primären tubulären Epithelzellen (TECs) wurden aus Wildtyp-Mäusen isoliert. Hierfür wurden die Mäuse, wie bereits beschrieben getötet, die Nieren entnommen, entkapselt, zerdrückt und anschließend 30 Minuten in Kollagenaselösung bei 37°C inkubiert. Danach wurden die teilweise verdauten Nierenstücke in HBSS/HEPES-Medium gegeben und durch einen 30 µm Filter gedrückt, um die groben Bestandteile zu entfernen.

Die gefilterte Suspension wurde 5 Minuten bei 4°C und 1100 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und anschließend der Niederschlag mit K1-Medium resuspendiert und auf unbeschichteten Petrischalen verteilt. Die Petrischalen wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, was dazu führte, dass Makrophagen und Fibroblasten sich am Boden der Petrischale anhefteten. Dann wurden die nicht-adhärenenten TECs, durch Abpipettieren des Mediums geerntet und 5 Minuten bei 1100 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die am Boden gesammelten TECs wurden mit K1-Medium resuspendiert und auf mit Kollagen beschichteten 6-*well*-Platten verteilt. Die Platten wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, so dass die TECs nach 7 Tagen eine teilweise konfluierende Schicht am Boden der Platte bildeten. Die anschließenden Stimulationsexperimente wurden mit diesen subkonfluierenden TECs durchgeführt.

### **Stimulation renaler Zellen mit LPS**

Für die Stimulationsexperimente wurden 0,5 x 10<sup>6</sup> Zellen der Makrophagen-Zelllinie J774 (Mφ) in 6-*well*-Platten mit RPMI-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Diese wurden zusammen mit den CD11b<sup>+</sup> Zellen, den CD11b<sup>-</sup> Zellen und den TEC mit 1 µg/ml Ultra Pure LPS pro *well*, oder normalem Medium als Kontrolle, stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde aus den Zellen die gesamte mRNA isoliert, in cDNA umbeschrieben und der Gehalt an IRAK M mRNA mittels RT-PCR quantifiziert.

### 2.1.3 Histologie

#### Herstellung der Parafinschnitte

Die für 24 Stunden in 4 % Formalinlösung gelagerten Nierenproben, wurden in Paraffin eingebettet, in 2 µm dünne Schnitte geteilt und auf APS-behandelten Objektträgern für 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Deparaffinierung mit Zylén und die Rehydrierung mit einer absteigenden Ethanolreihe: 3 x 5 Minuten Xylén, 3 x 3 Minuten Ethanol 100%, 2 x 3 Minuten Ethanol 96%, 1x 3 Minuten Ethanol 70%. Abschließend wurden die Schnitte 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen.

#### Masson-Goldner-Trichrom-Färbung

Die Trichrom-Färbung nach Masson-Goldner eignet sich zur Darstellung von Bindegewebe. Durch die Verwendung von drei verschiedenen Farbnuancen, lassen sich die Gewebekomponenten gut differenzieren. Zunächst werden die Zellkerne mit Eisenhämatoxylinlösung angefärbt. Die bei der anschließenden, eigentlichen Trichrom-Färbung, eingesetzten drei Farbstoffe, unterscheiden sich in ihrer Molekülgröße. Das kleinere Molekül (Ponceau, Orange G) dringt schneller in das Gewebe ein und färbt dieses. Das größere Molekül (Säurefuchsin, Lichtgrün) braucht länger, überfärbt dann aber das kleinere Molekül. Bevor das größere Farbmolekül alle Strukturen durchdrungen hat, wird die Färbung gestoppt. Die Goldner-Lösung I färbt Muskulatur, Zytoplasma (Ponceau) und Bindegewebe (Säurefuchsin) rot. Die danach aufgetragene Goldner-Lösung II färbt Erythrozyten orange (Orange G) und entfärbt das Bindegewebe wieder (Phosphorwolframsäure). Die abschließende Goldner-Lösung III (Lichtgrün SF) färbt schließlich das Bindegewebe grün [68].

Zunächst wurden die entparaffinierten Schnitte für 3 Minuten mit Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert gefärbt und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Daraufhin folgte die Färbung mit Goldner-Lösung I für 10 Minuten, eine Spülung mit 1 % Essigsäure für 30 Sekunden und die Differenzierung mit Goldner-Lösung II bis zur Entfärbung des Bindegewebes. Dieser Schritt wurde unter einem Mikroskop überprüft und dauerte meist zwischen 1-3 Minuten. Anschließend wurde erneut mit 1 % Essigsäure für 30 Sekunden gespült und mit Goldner-Lösung III für 5 Minuten gegengefärbt. Nach erneuten Waschschríten mit Essigsäure für 2-5 Minuten, einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-96-100%) und Xylol, wurden die Schnitte eingedeckt.

### **Immunhistochemie**

Für immunhistochemische Färbungen wurden die entparaffinierten Schnitte zunächst mit einem Gemisch aus 20 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 180 ml Methanol für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend für 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen, um die endogene Peroxidase zu blockieren. In einer Mischung aus 300 ml destilliertem Wasser und 3 ml *Antigen Unmasking Solution* wurden die Schnitte in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Dabei wurde alle 2,5 Minuten der Wasserstand überprüft und gegebenenfalls mit destilliertem Wasser aufgefüllt, bis die Schnitte 10 Minuten gekocht waren. Anschließend wurden sie für 20 Minuten abgekühlt und in PBS gewaschen. Zur Detektion des Antigens wurde das endogene Biotin blockiert. Zunächst mit einem Tropfen Avidin, und dann für 15 Minuten mit einem Tropfen Biotin. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper, je nach Typ für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Danach wurden die Schnitte zuerst für 30 Minuten mit einem biotinilierten Sekundär-Antikörper und danach für 30 Minuten in *ABC Solution*, bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Zwischen allen Schritten wurde immer 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Um den Antikörperkomplex sichtbar zu machen, wurde nach einem Waschschriff mit 200 ml vorgewärmten Tris eine Mischung aus 4 ml 3'3'Diaminobenzidine (DAB), 1 ml NiCL und 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet, was ein bräunlich-schwarzes Signal ergibt. Abschließend wurden die Schnitte mit Methylgrün gegengefärbt. Die überschüssige Farbe wurde noch in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96-100%) und Xylol entfärbt. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit *VectaMount* eingedeckt und getrocknet.

### **Auswertung mit Photoshop**

Die gefärbten Nierenschnitte wurden in 50-facher Vergrößerung, mittels des Lichtmikroskops fotografiert. Die Vergrößerung wurde so gering gehalten, um auf einem Foto, Rinde und Mark der Niere erkennen zu können. Die Fotos wurden anschließend mittels *Adobe Photoshop CS4 Extended Version* analysiert. Hierfür wurde das entsprechende Bild geöffnet, in der Menüleiste unter „Auswahl“ die Option „Farbbereich“ gewählt und mit dem Cursor, der Farbton, der signalpositiven Fläche, auf dem Foto ausgewählt. Die Software hat anschließend alle Bereiche mit der signalpositiven Fläche markiert. Mit dem Befehl „Messung Aufzeichnen“ wurde die signalpositive Gesamtfläche berechnet und in der Skaleneinheit Pixel angezeigt. Anschließend wurde die gemessene, signalpositive Fläche manuell ins Verhältnis zur Pixelfläche des Querschnitts der gesamten Niere gesetzt und als signalpositive Fläche in Prozent im Graphen angegeben.



### 2.1.4 Mikrodissektion

Diese Methode der Mikrodissektion wurde einer Publikation von Jean Oliver aus dem Jahre 1951 entnommen und teilweise verändert [69]. Die IRAK M-defizienten Mäuse wurden, wie oben beschrieben, mittels unilateraler Ischämie/Reperfusion operiert um ein akutes Nierenversagen auszulösen. Nach 5 Wochen Reperfusion wurden sie getötet, die Nieren entnommen, entkapselt und in 10 % Formalin-Lösung gelegt. Nach 4-wöchiger Fixationszeit wurden die Nieren mit einem Skalpel in ca. 2mm kleine Dreiecke geschnitten, welche Mark und Rinde enthalten haben. Die Stücke wurden für 3 Tage in 32 % HCl Lösung bei Raumtemperatur verdaut. Das Gemisch wurde anschließend auf einem Vortexer gemixt, mit Wasser verdünnt und mehrmals durch einen Zellfilter gewaschen, um die verbliebenen Säurereste zu entfernen. Die sich im Filter befindenden, isolierten Nephrone wurden mit 3 ml Wasser in eine Petrischale gespült und mittels Lichtmikroskopie morphologisch bewertet.

### 2.1.5 Molekularbiologie

#### Isolation von mRNA

Als Vorbereitung wurde die Arbeitsfläche mit Ethanol und *RNase Free* gereinigt, sterile Eppendorf-Röhrchen zum Auffangen der aufgereinigten RNA mit Etiketten versehen, sowie sterile 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen beschriftet und mit 350 µl 70 % Ethanol gefüllt. Sterile 2 ml Reaktionsgefäße wurden ebenfalls beschriftet und mit 600 µl Lyse-Puffer und Beta-Mercaptoethanol (Mischverhältnis 1:100) gefüllt. Ein Stück des Kortex wurde nun aus der in *RNA-later* gelagerten Nierenprobe geschnitten und in das Röhrchen mit Lyse-Puffer gegeben. Die Probe wurde für 30 Sekunden bei 17.500 Umdrehungen pro Minute, in dem zuvor mit Alkohol und destilliertem Wasser gereinigtem Homogenisator zerkleinert. Anschließend wurde sie zentrifugiert (3,5 Minuten, 10000 rpm), 350 µl des Überstands in das vorbereitete Gefäß mit dem Ethanol pipettiert und der Rest verworfen. Das Alkoholgemisch wurde für 1 Minute auf Stufe 8 des Vortexers gemischt. Der Inhalt wurde dann auf die Säulen des RNA-Kits gegeben und zentrifugiert (15 Sekunden, 10000 rpm). Nach dem Verwerfen des Filtrats wurde 700 µl Wash Buffer 1 auf die Säulen gegeben und erneut zentrifugiert (15 Sekunden 10 000 rpm). Nach einem Handschuhwechseln wurden die Säulen in neue Recoverytubes gesetzt, mit 500 µl Wash Buffer 2 befüllt und zentrifugiert (15 Sekunden 10000 rpm). Erneut wurde das Filtrat verworfen, die Säule mit 500 µl Waschpuffer 2 befüllt und zentrifugiert (2 Minuten 10000 rpm). Das Filtrat wurde entleert, das Recoverytube mit der Säule erneut 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Jetzt wurde die Säule in das etikettierte, sterile

Eppendorff-Röhrchen gesetzt, 33 µl RNase freies Wasser mittig auf den Boden der Säule pipetiert und 2 Minuten gewartet. Die so eluierte RNA wurde durch Zentrifugation (2 Min./10 000 rpm) in das Röhrchen gedrückt und sofort auf Eis gestellt, um die Konzentration zu messen.

### **Messung der mRNA-Konzentration**

Zum Messen der mRNA Konzentration wurde ein NanoDrop Spektrophotometer verwendet. Dieser wurde zuerst mit 3 µl RNase freiem Wasser geeicht. Je 3 µl der Probe wurden auf den Detektor gegeben und vermessen. Die Software gibt neben der Konzentration auch das 260nm/280nm Verhältnis an. Werte zwischen 1,7 und 2,2 zeigen eine reine RNA an. Zu niedrige Werte sind ein Zeichen für eine Proteinkontamination, zu hohe Werte für eine Verunreinigung mit DNA. Die Probe wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### **Umschreibung der mRNA in cDNA**

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus mRNA eine komplementäre cDNA hergestellt werden. Als Vorbereitung wurden sterile 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen etikettiert. Die zuvor isolierte RNA und die zur Umschreibung nötigen Reagenzien, mit Ausnahme der Enzyme, wurden auf Eis aufgetaut und je ein Thermomixer wurde auf 42 °C und 65 °C gestellt. In das vorbereitete Röhrchen wurde 1 µg RNA gegeben, mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt, bei 65°C für 5 Minuten inkubiert, anschließend zum Abkühlen auf Eis gestellt und vor Zugabe des Mastermixes kurz zentrifugiert. Zu jeder RNA-Probe wurde 10 µl Mastermix pipettiert. Für die Reaktion wurde die Probe bei 42°C für 90 Minuten im Thermomixer inkubiert. Danach wurde sie für 5 Minuten bei 85°C in den anderen Thermomixer gestellt, um durch die Hitze die enzymatische Reaktion zu stoppen. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde die Probe bei -20°C gelagert.

Als Kontrolle für Kontaminationen wurden zusätzlich RT- Proben angefertigt. Hierfür wurde dieselbe mRNA Konzentration, wie in der normalen cDNA Umschreibung verwendet, aber in dem Mastermix die Reverse Transkriptase, durch Wasser ersetzt. Dadurch konnte es zu keiner Umschreibung der mRNA in cDNA kommen. Bei der nachfolgenden RT-PCR konnte dann Anhand dieser Proben erkannt werden, ob die isolierte mRNA durch genomische DNA kontaminiert war.

### Real-Time qPCR (LightCycler 480)

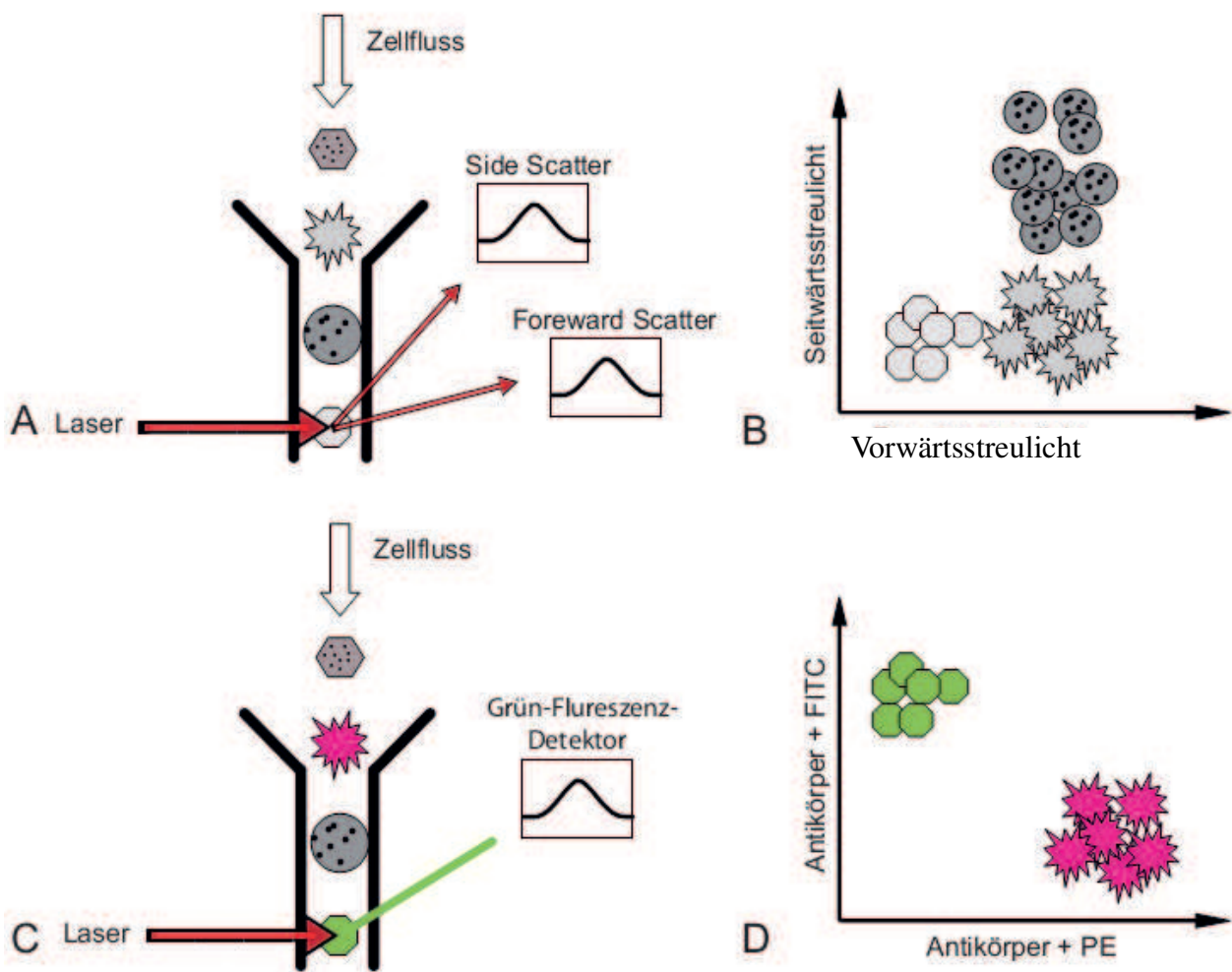
Mit der quantitativen *Real Time Polymerase Chain Reaktion* (qRT-PCR) können Nukleinsäuren vervielfältigt und mit Hilfe von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit quantitativ analysiert werden. Der Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen I lagert sich dabei in doppelsträngige DNA, was seine Fluoreszenz verstärkt. Das Signal steigt direkt proportional zur Anzahl der gebildeten PCR Produkte und wird am Ende jedes Elongationszykluses gemessen. Die PCR selbst, besteht aus drei sich wiederholenden Phasen: Denaturierung, Annealing, Elongation. Zunächst werden die Doppelstränge bei 95°C aufgebrochen. An die so entstandenen Einzelstränge lagern sich bei 60°C zwei komplementäre Oligonukleotide (Primer) an, welche die Zielsequenz zwischen sich einschließen. Diese dienen als Anfangsstück für die Verdopplung des Zielgens. Eine thermostabile Taq-Polimerase synthetisiert anschließend den komplementären Strang. Nach 45 Zyklen wurde die Zielsequenz exponentiell amplifiziert. In der ersten Phase der PCR ist die Amplifizierungsrate gering, da wenige Zielsequenzen vorhanden sind, was die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens von Zielsequenz, Primer und Enzym gering hält. Gegen Ende der PCR wiederum sind so viele Produkte vorhanden, das sie miteinander anstatt mit den Primern hybridisieren, was die PCR hemmt. Der optimale Zeitpunkt für die Quantifizierung liegt in einer exponentiellen Phase dazwischen. Ihr Anfang wird durch den Zyklus gekennzeichnet, in dem das Fluoreszenzsignal, erstmalig signifikant den Wert der Hintergrund-Fluoreszenz überschreitet. Dieser wird als *Threshold Cycle* (CT-Wert) bezeichnet. Zur Quantifizierung der relativen Expression ( $2^{\Delta CT}$ ) wird der CT-Wert des Zielgens mit dem CT-Wert des *housekeeping gen* 18S verglichen, um Variationen auszugleichen ( $\Delta CT = CT\ 18S - CT\ Zielgen$ ). Die relativen Expressionen der Zielgene wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben [70].

Für die quantitative RT-PCR wurde ein LightCycler 480 mit dem SYBR-Green-Detektions-System verwendet. Dabei wurden alle technischen Schritte nach den MIQE -Richtlinien durchgeführt [71]. Zunächst wurden von jeder Probe 0,2 µl cDNA mit 8,4 µl RNase freien Wasser verdünnt und in eine Vertiefung der 96-well-Platte pipettiert. Anschließend wurden 11,4 µl des PCR-Mastermixes zugegeben. Nach Auftragen aller Proben wurde die Platte mit einer Klarsichtfolie versiegelt und zentrifugiert. Im Lightcycler fand anschließend die Amplifizierung und Analyse der Proben, wie oben beschrieben statt. Im Anschluss an die 45 PCR-Zyklen wurde die Schmelzkurve generiert, mit der die Schmelzeigenschaft der Primer geprüft wurden. Hierfür wurden die Proben für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, anschließend auf 65°C gekühlt und dann langsam kontinuierlich wieder auf 95°C erwärmt. Die Schmelzkurve darf nur einen Peak aufweisen, bei mehreren Peaks oder unklaren Kurvenverlauf wurde die Probe verworfen. Proben, deren CT-Werte bis zum 35. Zyklus das Hintergrundrauschen des Farbstoffs nicht überschritten haben, wurden aus der Wertung genommen.

Als Kontrollen für die PCR dienten die während der cDNA-Herstellung generierten RT- Proben, welche keine cDNA enthalten und damit kein Signal erzeugten. Außerdem wurden Vertiefungen mit Wasser statt cDNA gefüllt, um Kontaminationen im PCR-Mastermix ausschließen zu können.

### 2.1.6 Durchflusszytometrie = FACS (fluorescence-activated cell sorting)

Ein Durchflusszytometer kann Zellen anhand ihrer unterschiedlichen Eigenschaften wie Größe, Struktur, Oberflächenbeschaffenheit und Granularität unterscheiden und Aussagen über die Anzahl von bestimmten Zelltypen und deren molekularen und physikalischen Eigenschaften treffen. Die zu analysierenden Zellen werden in Lösung gebracht und über eine Kapillare in das Durchflusszytometer gezogen, wo ein laminärer Flüssigkeitsstrom die Zellen einzeln durch einen gebündelten Laserstrahl leitet. Abhängig von den spezifischen Eigenschaften der Zelle wird der Strahl unterschiedlich gestreut. Der *forwardscatter* gibt Aussagen über die Größe und der *sidescatter* über die Granularität der Zelle. Zur weiteren Charakterisierung können Antikörper mit gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff oder sekundär fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet werden. Mittels spezifischer Antigen-Antikörper-Bindung können so bestimmte Zelltypen identifiziert werden. Die durch den Laserstrahl angeregten Fluoreszenzfarbstoffe emittieren proportional zur Menge der gebundenen Antikörper pro Zelle Licht einer bestimmten Wellenlänge. Die Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe erlaubt so eine weitere Differenzierung. Es muss hierbei jedoch ein Kompensationsschritt erfolgen, da die emittierten Wellenlängen überlappen können [72]. Die jeweils entnommene Niere wurde entkapselt und in eine Petrischale mit 2-3 ml kaltem Paris-Puffer gelegt. Mit Hilfe eines Skalpells und einer Spritze wurde sie anschließend zerkleinert, in ein 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml gekühlten 1xHBSS gewaschen und anschließend in 5 ml vorgewärmter Kollagenase/DNase Lösung für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml 1xHBSS, wurde das Pellet in 5 ml 2mM EDTA gelöst und 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Das angedaute Nierengewebe wurde nun mit einer Spritze und kleiner werdenden Nadeln (19G - 26G - 30G) zerkleinert und zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 10 ml gekühlten PBS ohne Ca/Mg wurde das Pellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert, durch einen 30 µm Zellfilter gedrückt und zentrifugiert. Nach einer Resuspension mit FACS-Puffer (200 bis 1000 µl) wurden die Zellen gezählt und 100 µl der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen gegeben und mit einem Serum-Mix (5 µl Mausserum + 5 µl Ratenserum) bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der phosphorylierte Antikörper zugegeben und 1 Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Abschließend erfolgten 2 Waschschriffe mit 2 ml gekühltem PBS. Mit 300µl des resuspendierten Pellets wurde die Durchflusszytometrie durchgeführt.



**Abbildung 11: Wirkungsweise eines Durchflusszytometers**

**A.** Durchquert eine Zelle den Laserstrahl, wird dieser in verschiedene Richtungen gestreut. Je größer die Zelle, desto höher der Ausschlag auf dem Vorwärtsstreulicht. Das Signal auf dem Seitwärtsstreulicht ist umso höher, je stärker die Zelle granuliert ist. **B.** Zellen mit ähnlichen Streueigenschaften sammeln sich in dem Diagramm, wodurch man einzelne Zellpopulationen unterscheiden kann. **C.** Die mit einem fluoreszierenden Antikörper markierte Zelle, emittiert ein Signal, welches detektiert wird und eine zusätzliche Differenzierung der Zelle erlaubt. **D.** Die mit PE rot markierten Zellen lassen sich jetzt von den mit FITC grün markierten Zellen in der Grafik unterscheiden.

### 2.1.7 Statistische Auswertung

Die experimentellen Gruppen bestanden aus 3 bis 15 Mäusen. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte mit Standardabweichung (+/-SEM) dargestellt. Die Gruppen wurden mittels *t-test* verglichen. p-Werte von < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

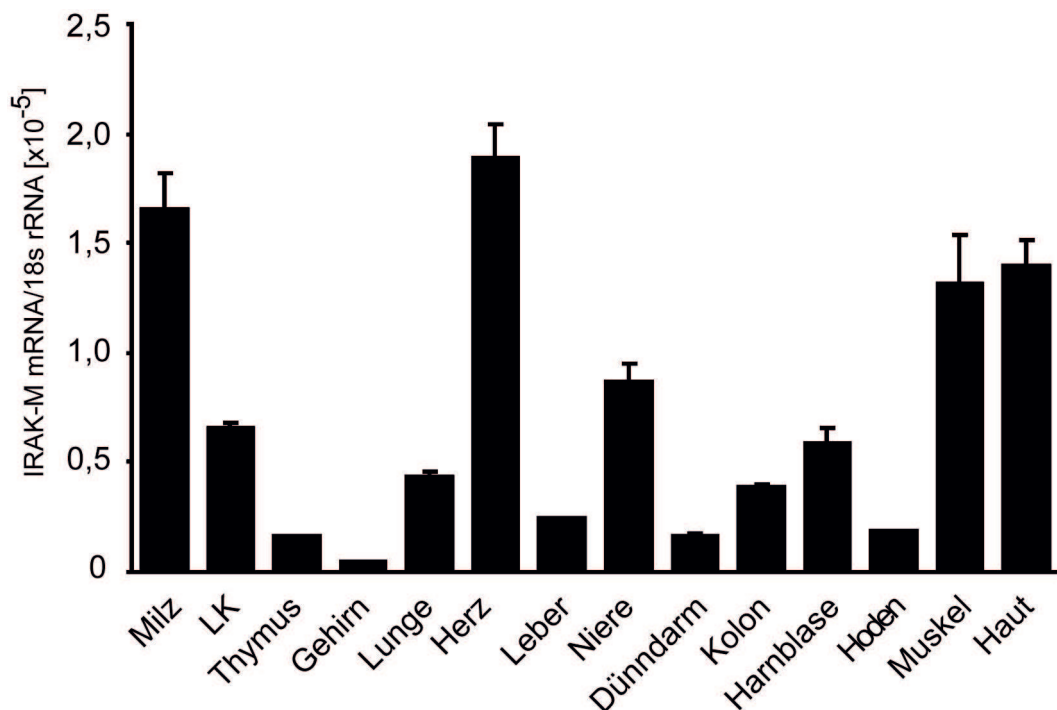
## **Kapitel 3**

### **Ergebnisse**

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Basale Expression von IRAK M in murinen Organen

Um zunächst eine Übersicht über das Vorkommen von IRAK M zu bekommen, wurden ganze Organe aus gesunden Wildtyp-Mäusen auf ihren Gehalt an IRAK M mRNA untersucht. Hierfür wurde die gesamte mRNA aus den jeweiligen Organen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR zeigte eine hohe basale Expression von IRAK M mRNA in der Niere, sowie in Milz, Herzmuskel, Muskel und Haut.



**Abbildung 12: Basale Expression der IRAK M mRNA**

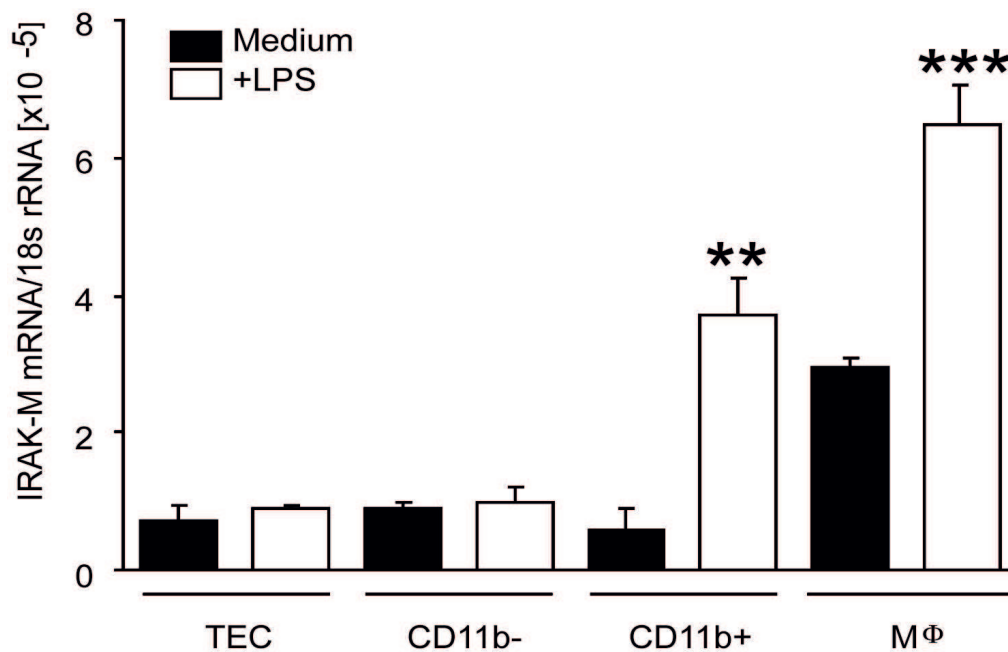
IRAK M mRNA wurde aus verschiedenen Organen gesunder Wildtyp-Mäuse isoliert und mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Es zeigte sich eine erhöhte Expression vor allem in Herzmuskel, Muskel, Milz, Haut und in der Niere. LK = Lymphknoten.

Die Daten stellen Mittelwerte der spezifischen mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM dar.

### **3.2 Gesteigerte Expression von IRAK M in Immunzellen durch LPS**

Um nun herauszufinden welche Zelltypen in der Niere IRAK M exprimieren, wurden tubuläre Epithelzellen aus gesunden Wildtyp-Mäusen gewonnen. Außerdem wurden CD11b- Nicht-Immun Zellen und CD11b+ Immunzellen, mittels MACS-Beads aus den Nieren gesunder Wildtyp-Mäuse isoliert. Zum Vergleich wurde zusätzlich die murine Makrophagen-Zelllinie J774 verwendet. Zur Stimulation wurde der TLR-Agonist LPS und als Kontrolle nur Medium zu den Zellen gegeben. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde die mRNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR quantifiziert. Es konnte eine signifikant vermehrte IRAK M Produktion nach Stimulation mit LPS in den CD11b+ Immunzellen, sowie in der Makrophagen-Zelllinie festgestellt werden. Tubuläre Epithelzellen und CD11b- Zellen zeigten auch mit LPS keine erhöhten IRAK M mRNA-Werte. Alle untersuchten Zelltypen produzierten ohne Stimulation bei Inkubation im normalen Zellmedium vergleichbare Mengen an IRAK M mRNA. IRAK M wird demnach nach Stimulation mit einem TLR-Agonisten in Immunzellen exprimiert. Epithelzellen und andere Nicht-Immunzellen konnten auch durch die Stimulation mit LPS nicht signifikant zur Expression von IRAK M angeregt werden.





**Abbildung 13: IRAK M Expression nach Stimulation mit LPS**

Die aus gesunden Wildtyp-Mäusen isolierten tubulären Epithelzellen (TEC) und die mittels MACS-Beads isolierten CD11b+ und CD11b- Zellen, sowie die murine Makrophagen-Zelllinie J774 (MΦ), wurden mit Lipopolysacchariden (LPS) stimuliert. In der Kontrollgruppe wurde den selben Zellen nur Medium zugegeben. Nach 24 Stunden wurde die IRAK M mRNA mittels RT-PCR quantifiziert. Alle Zellen zeigen ohne Stimulation vergleichbare geringe Mengen an IRAK M mRNA. In den CD11b+ Zellen und der Makrophagen-Zelllinie stieg die IRAK M Expression nach Stimulation mit LPS signifikant an, während sie in den TECs und den CD11b- Nicht-Immunzellen trotz LPS-Stimulation unverändert blieb.

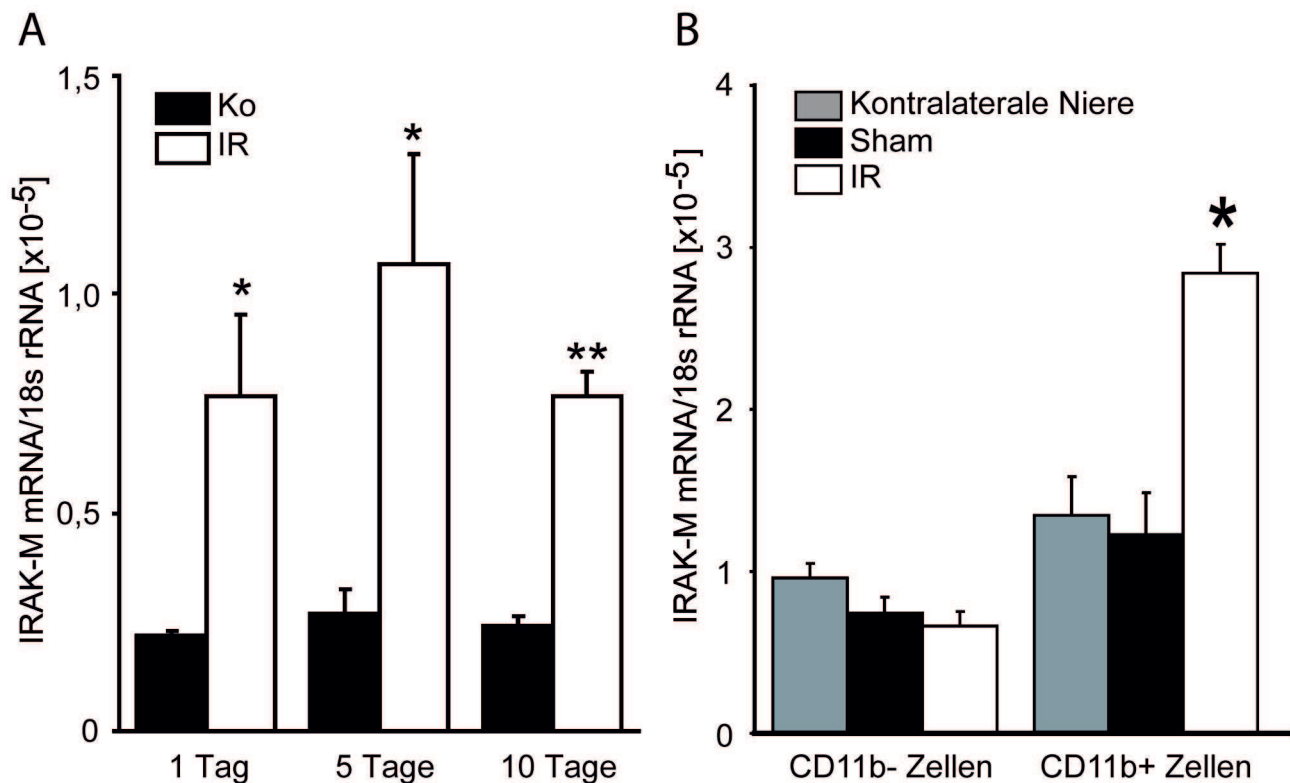
Daten dargestellt als Mittelwert der spezifischen mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0,001 gegenüber Medium.

### **3.3 Erhöhte Expression von IRAK M nach Ischämie/Reperfusion durch Immunzellen**

IRAK M hat eine hohe basale Expression in der Niere wird dort vor allem von CD11b+ Immunzellen gebildet. Daher wurde das Model der unilateralen Ischämie/Reperfusion gewählt, um die Expressionsmuster von IRAK M genauer charakterisieren zu können. Durch die Ischämie/Reperfusion wird ein akutes Nierenversagen in der operierten Niere induziert, die kontralaterale Niere hingegen bleibt gesund. Hierfür wurden einer Gruppe von Wildtyp-Mäusen für 45 Minuten die Gefäße am linken Nierenpol abgeklemmt und anschließend wiedereröffnet. Die kontralaterale rechte Niere wurde nicht manipuliert. 1, 5 und 10 Tage nach der Operation wurden die Mäuse getötet und beide Nieren entnommen. Aus den Nieren wurde die mRNA isoliert und mittels RT-PCR quantifiziert. Im Vergleich zu den kontralateralen gesunden Nieren zeigten sich in den postischämischen Nieren der operierten Mäuse zu allen drei Entnahmezeitpunkten signifikant höhere Konzentration von IRAK M mRNA. Die IRAK M Konzentration in den kontralateralen Kontrollnieren war zu allen drei Zeitpunkten jeweils konstant niedrig, ohne signifikante Unterschiede zueinander.

Um genauer charakterisieren zu können, welche Zellen IRAK M produzieren, wurden erneut Mäuse einer unilateralen Ischämie/Reperfusions-OP unterzogen. Als zusätzliche Kontrolle wurde eine Gruppe von Mäusen narkotisiert und mit einem Hautschnitt versehen, ohne jedoch die Niere zu manipulieren (Sham-OP). Durch die Sham-OP konnte der Stress durch die OP-Bedingungen und die Narkose selbst als Ursache für eine IRAK M Induktion ausgeschlossen werden. Alle Nieren wurden 24 Stunden nach der OP entnommen und die darin enthaltenen Zellen mittels MACS-Beads in CD11b+ und CD11b- Zellen getrennt. Aus diesen Zellpopulationen wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR analysiert. Im Vergleich zu den CD11b+ Zellen der kontralateralen gesunden Niere, zeigte sich eine signifikant vermehrte Produktion von IRAK M in den CD11b+ Zellen der mittels Ischämie/Reperfusion operierten Mäuse. Die CD11b+ Zellen aus den Nieren nach Sham-OP zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Expression von IRAK M im Vergleich zu der Kontrollniere. Die CD11b- Zellen produzierten weder nach Ischämie/Reperfusion, noch nach Sham-OP oder in der kontralateralen Niere vermehrt IRAK M.

Folglich wird IRAK M in der Phase des akuten Nierenversagens in der geschädigten Niere von Immunzellen vermehrt exprimiert. Nicht-Immunzellen konnten nicht zu einer vermehrten Produktion von IRAK M angeregt werden. Die Sham-OP hat keinen Einfluss auf die IRAK M Produktion.



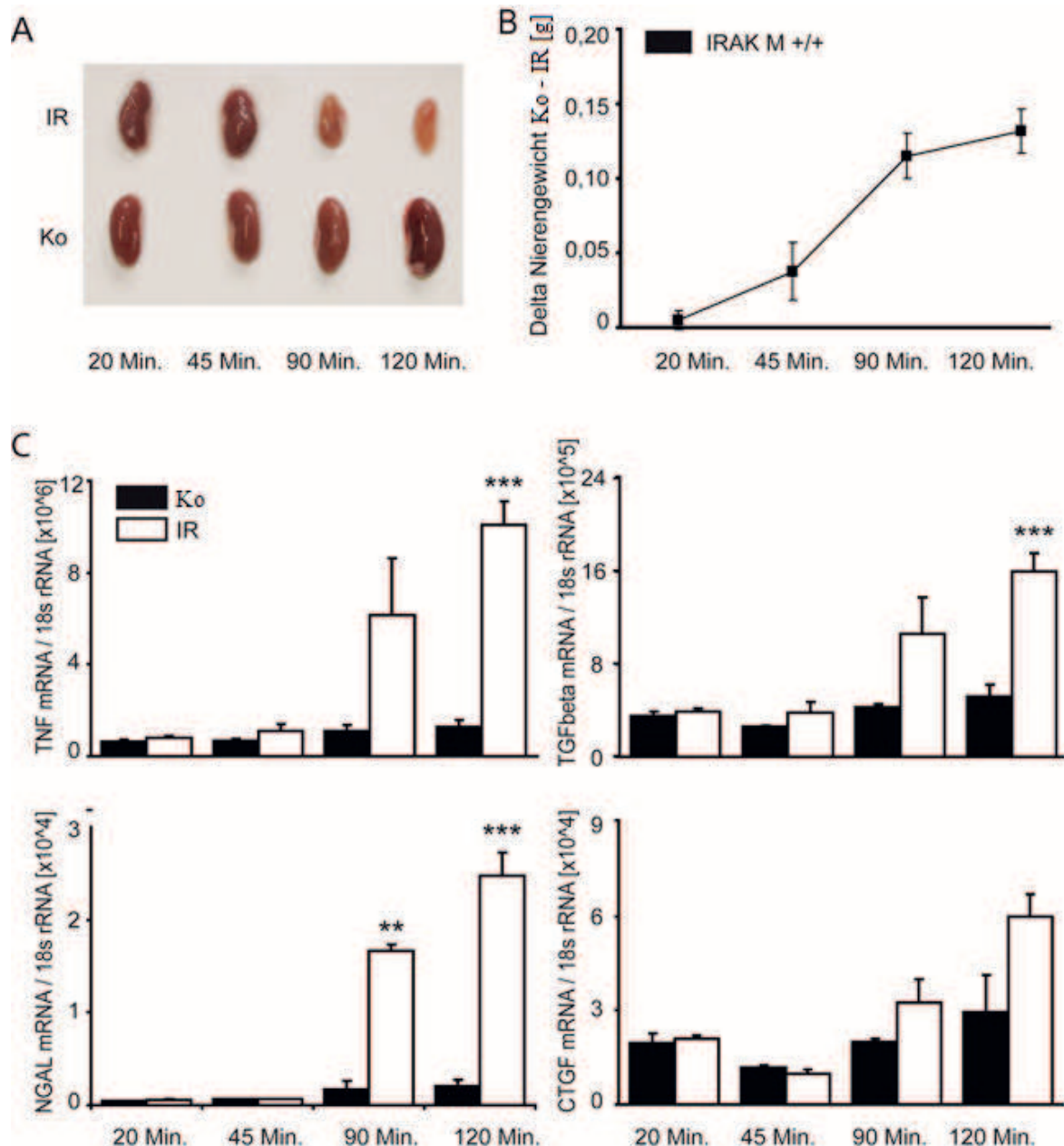
**Abbildung 14: Erhöhte IRAK M Expression durch Immuzellen nach Ischämie/Reperfusion**

**A.** An Wildtyp-Mäusen wurde eine unilaterale Ischämie/Reperfusion durchgeführt. 1,5 und 10 Tage nach der Operation wurden die Nieren entnommen und mittels RT-PCR auf ihren Gehalt an IRAK M mRNA untersucht. Es zeigten sich signifikant höhere IRAK M mRNA Level in den operierten Nieren (IR), im Vergleich zu den kontralateralen Kontrollnieren (KO) derselben Maus. **B.** An Wildtyp-Mäusen wurde eine unilaterale Ischämie/Reperfusion (IR) oder eine Sham-OP (Sham) durchgeführt. Als Kontrolle diente jeweils die nicht intervenierte kontralaterale Niere. Die Nieren wurden 24 Stunden nach der OP entnommen. Die Zellen in den Nieren wurden durch MACS-Beads in CD11b+ und CD11b- eingeteilt, jeweils die mRNA isoliert und mittels RT-PCR quantifiziert. Es zeigte sich eine vermehrte Produktion von IRAK M in den CD11b+ Zellen aus den postischämischen Nieren, alle anderen untersuchten Zellen zeigten keine vermehrte Expression von IRAK M mRNA. Daten dargestellt als Mittelwert der spezifischen mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  gegenüber der kontralateralen Niere.

### 3.4. Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung durch eine längere Ischämiezeit

Obwohl IRAK M in Immunzellen durch einen Ischämie/Reperfusions-Schaden vermehrt exprimiert wird hat es, wie Vorarbeiten im gleichen Labor zeigen konnten, keinen Einfluss auf die initiale Phase des akuten Nierenversagens. Wir vermuteten daher, dass die Mehrexpression von IRAK M erst auf die spätere Heilungsphase einen bedeutenden Einfluss hat. Deshalb entwickelten wir ein Langzeitmodell um die Rolle von IRAK M in der Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens bestimmen zu können. Zunächst wurde nun nach den geeigneten Rahmenbedingungen für ein Langzeitmodell gesucht. Um zeigen zu können, ob und wie IRAK M auf die Regeneration der Niere wirkt, wurde zunächst der Einfluss von weiterer Faktoren auf die Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens, in der Wildtypmaus untersucht.

Hierfür wurde der Einfluss der Ischämiedauer auf die Nieren der Wildtyp-Mäuse untersucht. Je einer Gruppe von Mäusen wurde für 20, 45, 90 und 120 Minuten, die linken Nierengefäße mit einem Clip verschlossen und anschließend wieder eröffnet. Die Nieren wurden 5 Wochen später isoliert, fotografiert und gewogen. Die postischämischen Nieren, mit einer Ischämiezeit von 20 und 45 Minuten, zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu den gesunden kontralateralen Nieren. Beide Nieren derselben Maus waren morphologisch vergleichbar und unverändert. Die postischämischen Nieren mit einer Ischämiezeit von 90 und 120 Minuten waren optisch atrophiert und hatten im Vergleich zu ihren kontralateralen Nieren an Gewicht verloren. Zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps wurde aus den Nieren die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR quantifiziert. Hierbei zeigten die atrophisierten Nieren nach 90- und 120-minütiger Ischämie eine vermehrte Expression von *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL). NGAL ist ein bekannter Marker für tubulären Nierenschaden. Ebenso hochreguliert war das proinflammatorische und proapoptotische Zytokin *tumor necrosis factor alpha* (TNF- $\alpha$ ) und die Fibrosemediatoren *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ) und *connective tissue growth factor* (CTGF). Dieser Anstieg war in den postischämischen Nieren, nach 20 und 45 Minuten Ischämiezeit, nicht nachweisbar. Die kurze Ischämiezeit von 20 und 45 Minuten hatte demnach keinen negativen Einfluss auf die Regeneration der postischämischen Niere. Da die Wildtyp-Mäuse für die nachfolgenden Experimente mit den IRAK M-defizienten Mäusen als gesunde Kontrollen dienen sollten, wurde für alle weiteren Experimente eine Ischämiezeit von 45 Minuten festgelegt.



**Abbildung 15: Das Ausmaß der chronischen Nierenschädigung ist abhängig von der initialen Ischämiezeit**

**A.** An Wildtyp-Mäusen wurde eine unilaterale Ischämie/Reperfusion mit unterschiedlichen Ischämiezeiten (20, 45, 90, 120 Minuten) durchgeführt. Nach 5 Wochen wurden die Nieren entnommen, fotografiert und gewogen. **B.** Das Gewicht ist dargestellt als Delta: Gewicht der nicht operierten Niere minus Gewicht der operierten Niere. Die operierte linke Niere (IR) zeigt nach 20- und 45-minütiger Ischämie, keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu der nicht manipulierten rechten Kontrollniere (Ko). Ab 90-minütiger Ischämie bilden sich morphologisch Schrumpfnieren mit einem verminderten Gewicht. **C.** Aus den Nieren wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Werte für NGAL, TNF  $\alpha$ , CTGF und TGF  $\beta$  quantifiziert. Ab einer Ischämiezeit von 90 Minuten zeigen sich in den postischämischen Nieren, signifikant erhöhte mRNA Expressionen der Entzündungsparameter NGAL und TNF  $\alpha$ , sowie der profibrotischen Mediatoren CTGF und TGF  $\beta$ .

Daten dargestellt als Mittelwert der spezifischen mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber der kontralateralen Niere.

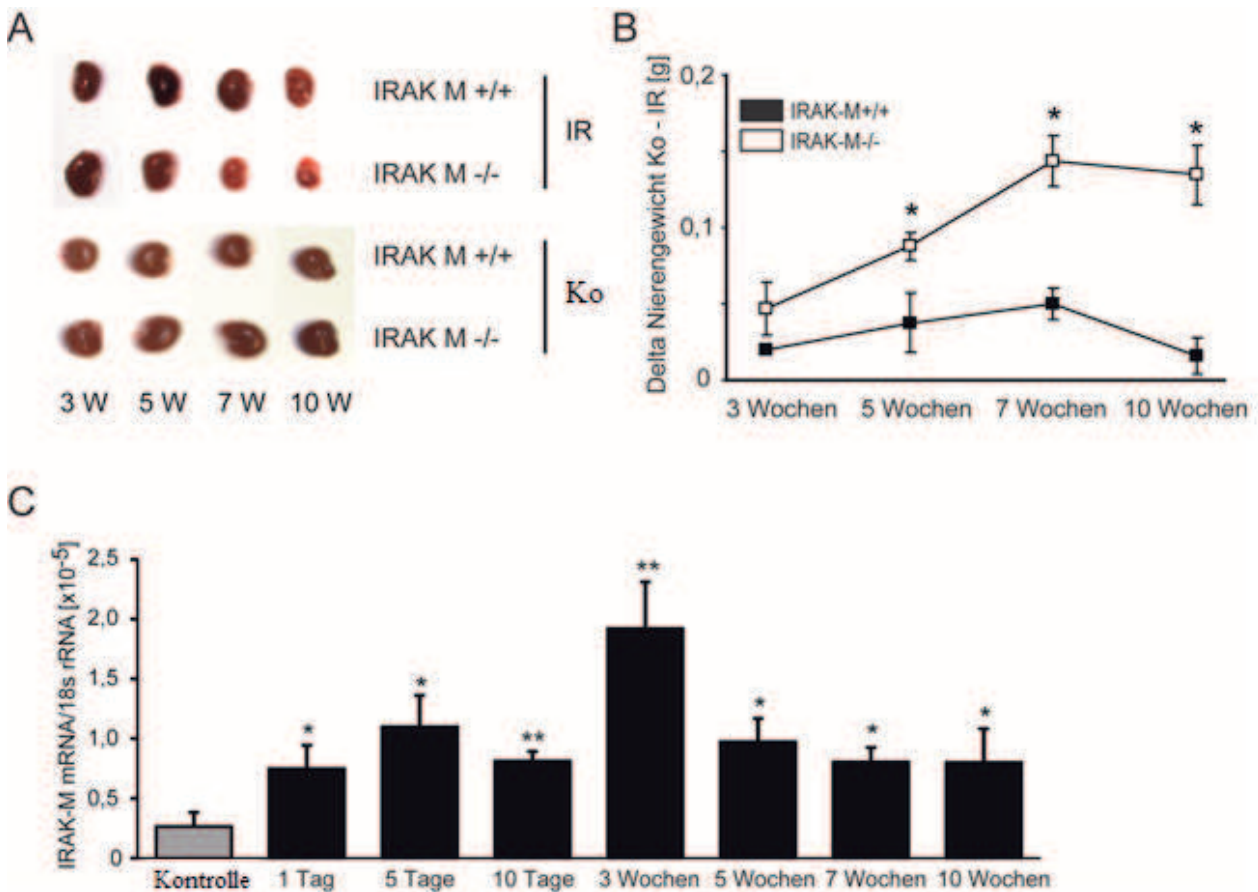
### **3.5 IRAK M verhindert die Bildung eines chronisch-auf-akuten Nierenschadens**

#### **3.5.1 Die vermehrte Expression von IRAK M verhindert die Entstehung atropher Nieren**

Nach einem ANV hat IRAK M vermutlich einen Einfluss auf die Heilung und die Wiederherstellung der Nierenfunktion. Deshalb wurde nun zunächst der zeitliche Verlauf der IRAK M Expression und dessen Einfluss auf die Nierenmorphologie untersucht. Hierfür wurde in Wildtyp-Mäusen und IRAK M-defizienten Mäusen vergleichbaren Alters und gleichen Geschlechtes eine unilaterale Ischämie/Reperfusion für 45 Minuten bei 35-37°C durchgeführt. Nach einer Reperfusionsdauer von 3, 5, 7 und 10 Wochen wurden die Nieren entnommen und untersucht. Die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse verloren ab der 5. Woche nach der Operation signifikant an Größe und Gewicht, im Vergleich zu den entsprechenden kontralateralen Nieren. Die operierten Nieren der Wildtyp-Mäuse blieben zu allen 4 Zeitpunkten unverändert und unterschieden sich morphologisch nicht von ihren kontralateralen Kontrollnieren.

Aus den in diesem Experiment gewonnenen Nieren der Wildtyp-Mäuse wurde die IRAK M mRNA isoliert und mittels RT-PCR quantifiziert. In Kombination mit den mRNA-Werten aus Experiment 3.3 konnte so der zeitliche Verlauf der IRAK M Induktion nach unilateraler Ischämie/Reperfusion in der postischämischen Niere dargestellt werden. Es zeigte sich ein Maximum der Expression in der dritten, postoperativen Woche. Zu allen Zeitpunkten war die IRAK M Expression in der operierten Niere höher als in der kontralateralen Niere.

Dies ist ein Hinweis darauf, dass die vermehrte Expression von IRAK M in der Niere nach einer Schädigung benötigt wird, um Langzeitschäden im Sinne einer Atrophie der Niere verhindern zu können.



**Abbildung 16: Der Mangel an IRAK M führt zur Bildung von Schrumpfnieren**

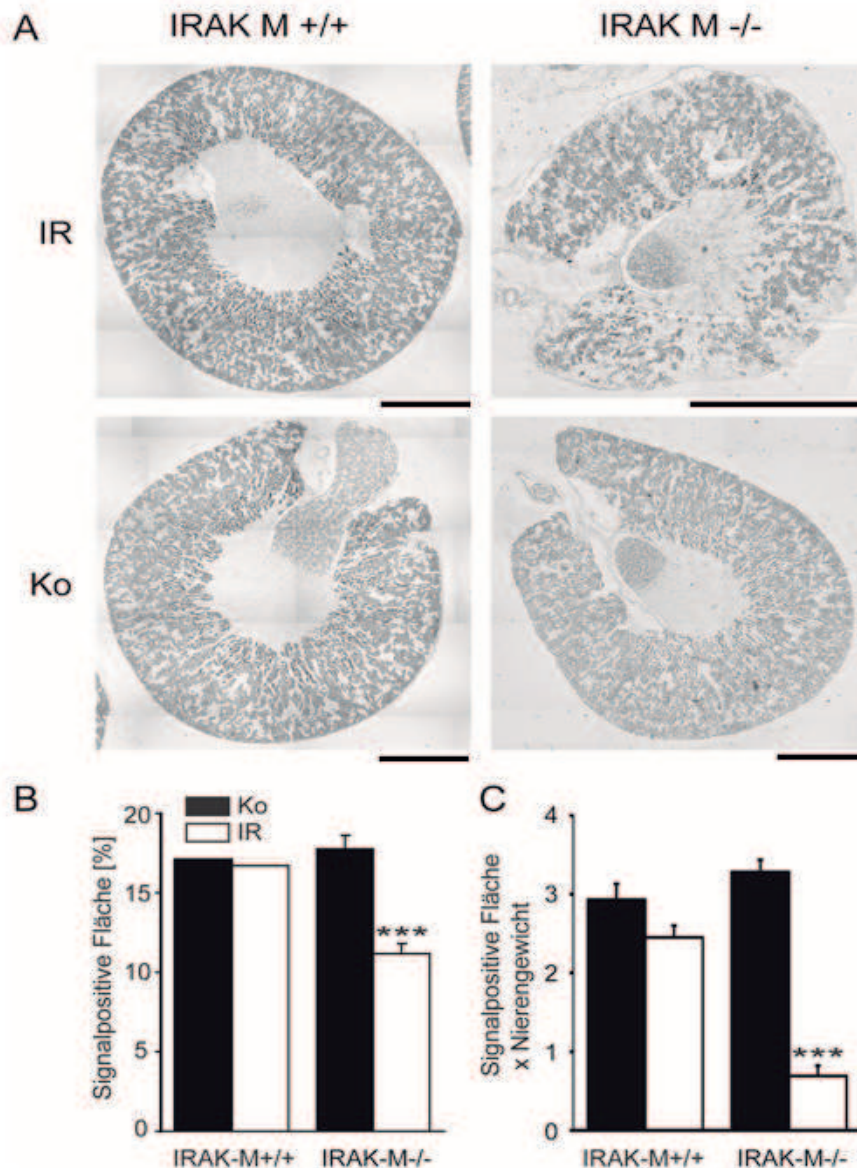
**A.** Wildtyp-Mäuse (IRAK +/+) und IRAK M-defiziente Mäuse (IRAK M -/-) wurden mittels Ischämie/Reperfusion operiert und die Nieren 3, 5, 7 und 10 Wochen nach der OP entnommen, fotografiert und gewogen. Dargestellt sind die postischämischen linken Nieren (IR) und die dazu gehörigen gesunden, rechten Nieren (Ko) nach 45-minütiger Ischämie. Die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse wurden im Verlauf von 3 bis 10 Wochen Reperfusionszeit kleiner. Die postischämischen Nieren des Wildtyps und die kontralateralen Kontrollen beider Gruppen zeigen zu keinem Zeitpunkt morphologische Unterschiede zueinander. **B.** Die postischämischen Nieren des IRAK M -/- verloren mit zunehmender Reperfusionsdauer an Gewicht. Die Wildtypnieren und die kontralateralen Nieren veränderten ihr Gewicht nicht signifikant. Das Gewicht ist dargestellt als Delta: Gewicht der nicht operierten minus Gewicht der operierten Niere. **C.** Aus den postischämischen Nieren des Wildtyps nach 3, 5, 7, 10 Wochen Reperfusion wurde die IRAK M mRNA isoliert und mittels RT-PCR quantifiziert. Um die Expression im Verlauf sehen zu können, wurden die IRAK M Expressionswerte aus dem Experiment 3.3 in die Grafik eingefügt. Drei Wochen nach der Operation fand sich die höchste Konzentration von IRAK M mRNA in den postischämischen Nieren. Zu allen Zeitpunkten waren die IRAK M mRNA Level in den operierten Nieren höher, als in den kontralateralen Kontrollnieren (Kontrolle).

Daten dargestellt als Mittelwert der spezifischen mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  gegenüber dem Wildtyp bzw. der kontralateralen Kontrolle in C

### 3.5.2 IRAK M verhindert den Verlust proximaler Tubulussegmente

Es stellte sich die Frage, was zur Atrophie der Nieren geführt hatte. Zur weiteren Charakterisierung des Phänotyps wurden die Nieren nach 45-minütiger Ischämie und 5 Wochen Reperfusionszeit genauer untersucht. Erster Schritt war die Erstellung histologischer Schnitte, gefärbt mit *Lotus tetragonobulus lectin*, was proximale Tubulusabschnitte schwarz anfärbt. Die makroskopisch unauffälligen postischämischen Nieren des Wildtyps zeigten bei mikroskopischer Betrachtung die selben Mengen an schwarz gefärbter Fläche wie die dazugehörigen kontralateralen Nieren. Dies schloss einen Verlust an proximalen Tubulussegmenten im Wildtyp aus. Die kontralateralen Nieren der Wildtyp-Mäuse und IRAK M-defizienten Mäuse, wiesen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Menge an schwarz gefärbter Fläche auf. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die IRAK M-defizienten Mäuse von Anfang an weniger proximale Tubulussegmente hatten. Die atrophierten, postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse waren kleiner als ihre kontralateralen Kontrollen. Um ein verfälschtes Ergebnis durch die kleinere Querschnittsfläche der atrophierten Nieren auszuschließen, wurde die schwarz angefärbte Fläche der proximalen Tubulussegmente als Prozent der Gesamtfläche des Nierenquerschnitts angegeben. Hierbei zeigte sich ein niedrigerer Anteil an signalpositiver Fläche in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse im Vergleich zu den dazugehörigen kontralateralen Nieren. Besonders deutlich wird der Verlust von proximalen Tubulussegmenten, wenn man den Anteil der signalpositiven Fläche im Verhältnis zum Gesamtgewicht der jeweiligen Niere setzt. Hier zeigt sich kein Unterschied im Wildtyp, aber eine signifikante Differenz in den IRAK M-defizienten Mäusen. Damit konnte der Verlust von Teilen des proximalen Tubulussystems als Ursache für die Atrophie der postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse identifiziert werden.





**Abbildung 17: Verlust von proximalen Tubulussegmenten in der postischämischen Niere der IRAK-M-defizienten Mäuse**

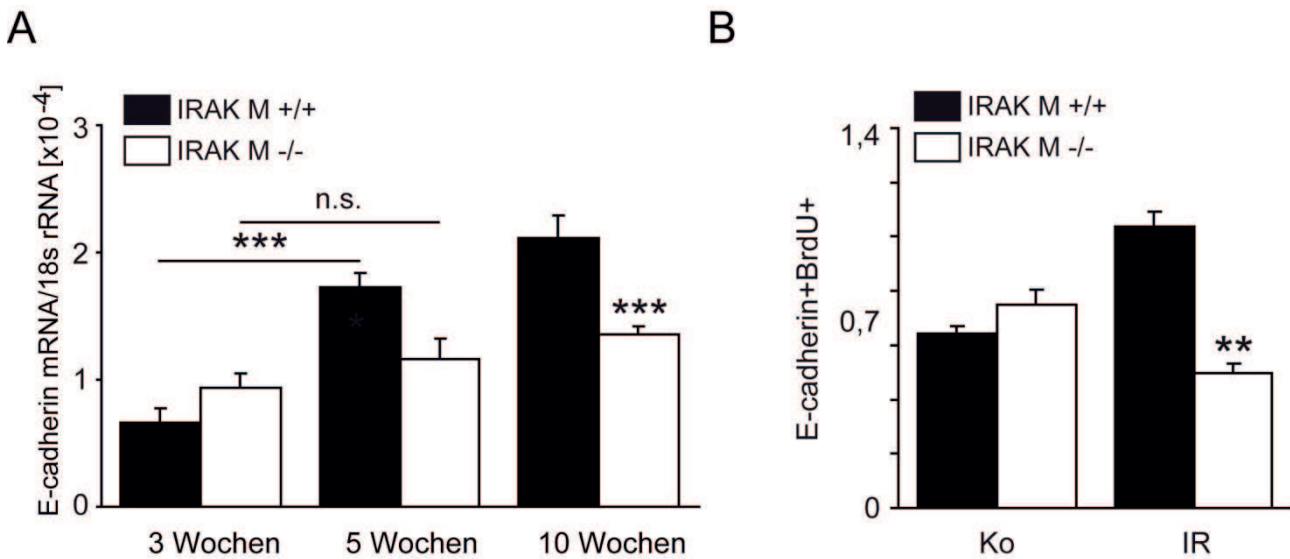
**A.** 5 Wochen nach 45-minütiger, unilateraler Ischämie/Reperfusion wurden histologische Schnitte mit Lotus tetragonolobus lectin angefertigt, um die Anteile des proximalen Tubulussystems schwarz darzustellen. Die postischämische Niere (IR) der IRAK M-defizienten Mäuse (IRAK M  $-/-$ ) zeigte eine deutlich verminderte Gesamtgröße. Die postischämischen Nieren der Wildtyp-Mäuse (IRAK  $+/+$ ) und die kontralateralen Nieren (KO) beider Genotypen stellen sich morphologisch gleich dar. Der schwarze Balken repräsentiert jeweils 1 mm im Originalbild. **B.** Die Auswertung der mit Lotus tetragonolobus lectin gefärbten Schnitte erfolgte mittels Prozent schwarz angefärbter Fläche, bezogen auf die gesamte Querschnittsfläche der jeweiligen Niere. Im Wildtyp zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Menge an schwarz gefärbter Fläche. Die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse wiesen signifikant weniger schwarz markierte proximale Tubulussegmente auf, als die dazugehörige Kontrollniere und beide Nieren des Wildtyps. **C.** Dargestellt ist die signalpositive Fläche der markierten proximalen Tubulussegmente pro Schnitt, bezogen auf das Gewicht der jeweiligen Niere.

Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$  gegenüber dem Wildtyp.

### **3.5.3 Verlust proximaler Tubulussegmente durch fehlende Proliferation verbliebener Epithelzellen**

Um genauer untersuchen zu können wie es zu dem Verlust an proximalen Tubuluszellen gekommen ist, wurden die mRNA Level von E-Cadherin in den Nieren bestimmt. E-Cadherin ist ein Marker für feste Zell-Zell-Kontakte und wird von intakten Epithelverbänden exprimiert. Hierfür wurde die mRNA aus Nieren von Wildtyp-Mäusen und IRAK M-defizienten Mäusen nach 45-minütiger Ischämie und 3, 5 und 10-wöchiger Reperfusion isoliert und der Gehalt an E-Cadherin mRNA quantifiziert. In der morphologisch unauffälligen postischämischen Wildtypniere kam es im Verlauf von 3 bis 10 Wochen zu einer progredienten Expression von E-Cadherin. In den atrophierten Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse bleiben die Level an E-Cadherin mRNA in den Wochen nach der Ischämie gleich. Ein Anstieg, welcher auf eine Regeneration des Epithels hindeuten würde, fehlt. 10 Wochen nach der akuten Nierenschädigung zeigten die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse eine signifikant geringere Expression von E-Cadherin im Vergleich zum Wildtyp.

Zur weiteren Analyse wurde Wildtyp-Mäusen und IRAK M-defizienten Mäusen nach der unilateralen Ischämie/Reperfusion Bromodeoxyuridin (BrdU) injiziert, um die teilungsfähigen Zellen zu markieren. BrdU ist ein Thymidinanalogon und wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA aktiv proliferierender Zellen eingebaut. Die Injektion erfolgte 24 Stunden vor der Tötung der Tiere. 5 Wochen nach der Operation wurden die Tiere getötet und die postischämischen Nieren für eine Durchflusszytometrie entnommen. Eine genaue Betrachtung der renalen Zellen zeigte einen signifikant geringeren Anteil der BrdU/E-Cadherin doppeltpositiven Zellen in den IRAK M-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Dies weist darauf hin, dass die verminderte Proliferation der verbliebenen Tubulusepithelzellen eine Ursache für den Verlust der proximalen Tubulussegmente in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse war.



**Abbildung 18: Der fehlende Anstieg der E-Cadherin Expression zeigt eine mangelnde Regenerationkapazität der IRAK M-defizienten Nieren**

**A.** Aus den postischämischen Nieren von Wildtyp-Mäusen (IRAK M +/+) und IRAK M-defizienten Mäusen (IRAK M -/-), nach 45-minütiger unilateraler Ischämie und 5-wöchiger Reperfusion, wurde mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Menge an E-Cadherin mRNA mittels RT-PCR quantifiziert. Es zeigte sich einen Anstieg der E-Cadherin mRNA im Wildtyp im Verlauf von 3 bis 10 Wochen. Die Menge an E-Cadherin mRNA im Knockout blieb über die Wochen unverändert und war 10 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion signifikant niedriger als im Wildtyp. **B.** Proliferierende Tubuluszellen wurden mittels Durchflusszytometrie, 5 Wochen nach 45-minütiger Ischämie/Reperfusion, quantifiziert. Es zeigten sich weniger Bromodeoxyuridin(BrdU)/E-Cadherin doppeltpositive Zellen in den Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Nieren des Wildtyps.

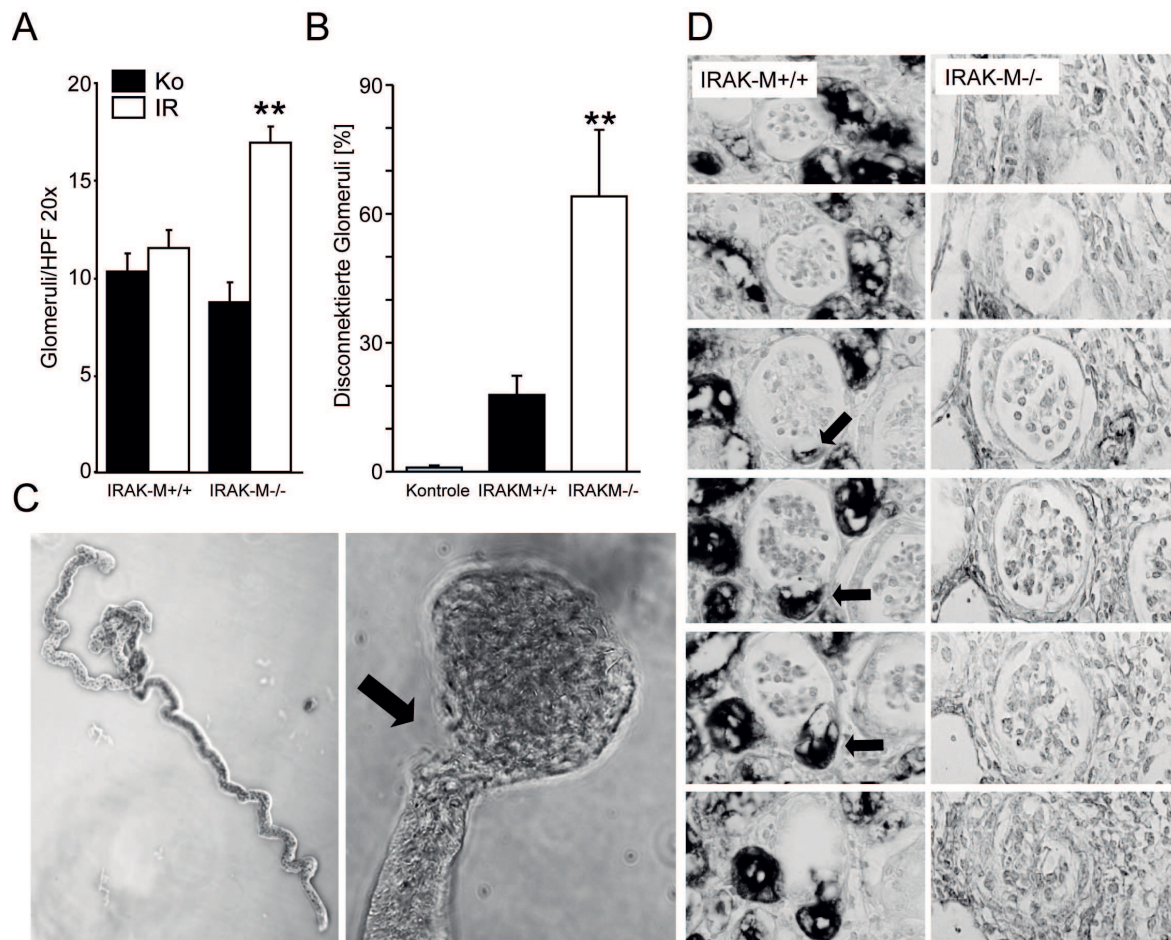
Daten dargestellt als Mittelwert der spezifischen mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM \*\*p< 0,01; \*\*\*p<0,001.

### **3.5.4 Bildung atubulärer Glomeruli durch Schädigung der glomerulär-tubulären Verbindungszone**

Eine histomorphologische Auffälligkeit in den atrophischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse, 5 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion, war die vergrößerte Dichte von Glomeruli in der Nierenrinde. Die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse hatten signifikant mehr Glomeruli pro Gesichtsfeld, im Vergleich zu den postischämischen Nieren des Wildtyps. Um diese dicht angeordneten Glomeruli genauer charakterisieren zu können, wurden serielle Schnitte mit Lotus tetragonolobus lectin angefärbt. Bei genauer Verfolgung desselben Glomerulus durch die einzelnen Schnitte im Lichtmikroskop, konnte nun gesehen werden, ob es eine intakte Verbindung zu einem sich anschließenden proximalen Tubulus hat oder nicht. Bei der Auswertung der seriellen Schnitte, war der Anteil an atubulären Glomeruli in den operierten Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse signifikant höher als im Wildtyp. Durch den Ischämie/Reperfusionsschaden entstehen, ohne die Wirkung von IRAK M, demnach vermehrt funktionslose Glomeruli ohne Verbindung zum Tubulussystem.

Um eine mögliche Ursache für die Bildung der atubulären Glomeruli zu finden, wurde eine Mikrodissektion der operierten Nieren durchgeführt. Hierfür wurde an IRAK M-defizienten Mäusen eine unilaterale Ischämie/Reperfusion durchgeführt, die Nieren 5 Wochen danach entnommen und wie im Methodenteil beschrieben behandelt. Es zeigten sich neben einigen intakten Nephronen viele Nephronen mit Schäden in der glomerulär-tubulären Verbindungszone und zahlreiche einzelne Glomeruli ohne sich anschließenden, abführenden proximalen Tubulus.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass IRAK M nach dem akuten Nierenversagen benötigt wird, um Schäden in der Verbindung zwischen Glomerulus und proximalen Tubulus verhindern zu können. Ohne IRAK M kommt es zur Bildung von atubulären Glomeruli ohne intakte Verbindung zum Tubulussystem.



**Abbildung 19: Bildung atubulärer Glomeruli in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse**

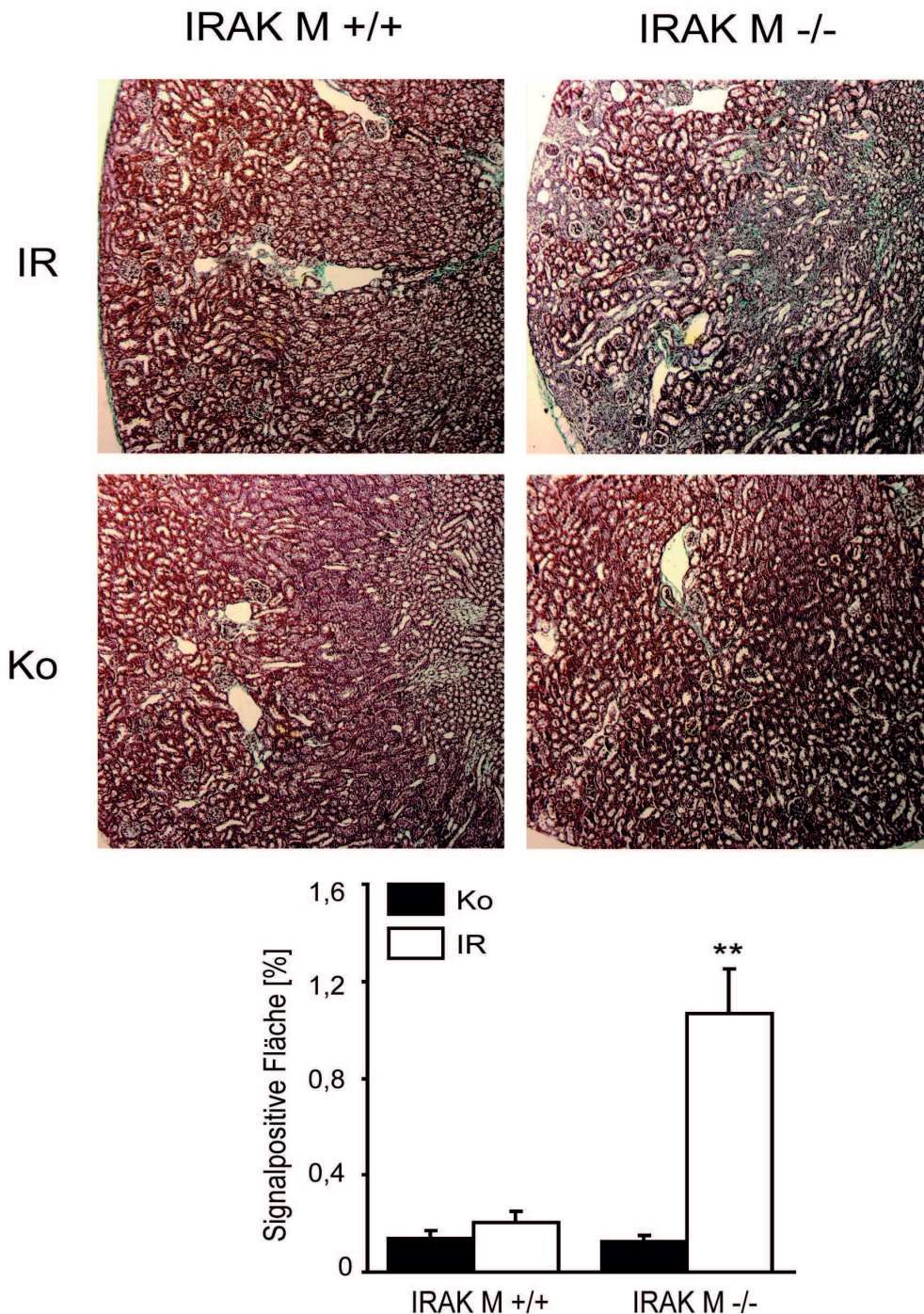
**A.** In mit Lotus tetragonolobus lectin gefärbten Schnitten von Wildtyp-Mäusen (IRAK M +/+) und IRAK M-defizienten Mäusen (IRAK M -/-), nach 45-minütiger Ischämie und 5-wöchiger Reperfusion, wurden bei 100-facher Vergrößerung die Anzahl der Glomeruli pro Gesichtsfeld gezählt. In den postischämischen Nieren (IR) des Knockouts zeigte sich im Kortex eine erhöhte Dichte an Glomeruli im Vergleich zur kontralateralen Niere (KO). **B.** Aus den Nieren wurden serielle histologische Schnitte gefertigt und mit Lotus tetragonolobus lectin gefärbt. Die Glomeruli wurden durch alle Schichten verfolgt und dabei nach einem Anschluss an einen proximalen Tubulus gesucht. Dabei fanden sich atubuläre Glomeruli, welche in den postoperativen Wildtypnieren, den IRAK M-defizienten Nieren und in den kontralateralen Kontrollen quantifiziert wurden. Der Anteil an atubulären Glomeruli wurde in Prozent zur Gesamtanzahl angegeben. In den IRAK M-defizienten Nieren zeigten sich signifikant mehr atubuläre Glomeruli als in den Nieren des Wildtyps. **C.** Eine Mikrodissektion wurde an postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse 5 Wochen nach unilateraler Ischämie/Reperfusion durchgeführt. Es zeigten sich neben Nephronen mit intakter Verbindung zum Tubulussystem (linke Hälfte) viele Nephronen mit Schäden in der glomerulär-tubulären Verbindungszone (rechte Hälfte). Bildausschnitt 50x bzw. 100x vergrößert. **D.** Darstellung der seriellen Schnitte der postischämischen Nieren 5 Wochen nach Ischämie/Reperfusion. Im Wildtyp (linke Hälfte) hat das verfolgte Glomeruli einen intakten Anschluss an das zugehörige, schwarz markierte Tubulussystem. In der IRAK M-defizienten Niere (rechte Hälfte) fanden sich Glomeruli ohne sichtbaren Abgang eines proximalen Tubulus. Repräsentativer Bildausschnitt, 200x vergrößert. Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM \*\* $p < 0,01$ .

### 3.5.5 IRAK M verhindert die übermäßige Produktion von interstitieller Fibrose

Die chronische Niereninsuffizienz ist charakterisiert durch fibrotische Umbauvorgänge und das vermehrte Vorkommen von extrazellulärer Matrix. Da wir vermuteten, dass der Mangel an IRAK M zu der Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens führt, wurden die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse nun auf ihren Gehalt an interstitieller Fibrose untersucht. Um den Anteil an extrazellulärer Matrix quantifizieren zu können, wurden aus den Nieren nach 45 Minuten Ischämie und 5 Wochen Reperfusion histologische Schnitte angefertigt und mit *smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA) und Masson Trichrom gefärbt. Die Schnitte wurden bei 50-facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop fotografiert und anschließend mittels Photoshop ausgewertet, wie im Methodenteil beschrieben. In der Masson Trichrom Färbung zeigt sich in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse eine signifikant vermehrte Akkumulation von grünlich-grau gefärbter, extrazellulärer Matrix im Vergleich zur Wildtypniere. Die Wildtypnieren und die kontralateralen Kontrollnieren der IRAK M-defizienten Mäuse wiesen keine Mehranreicherung von extrazellulärer Matrix auf und unterschieden sich morphologisch nicht voneinander. Als weiteren histologischen Marker für interstielle Fibrose verwendeten wir  $\alpha$ -SMA. Die Färbung mit  $\alpha$ -SMA zeigte ein signifikant stärkeres Signal in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp und den kontralateralen Kontrollen, was für ein vermehrtes Vorkommen von interstitieller Fibrose spricht.

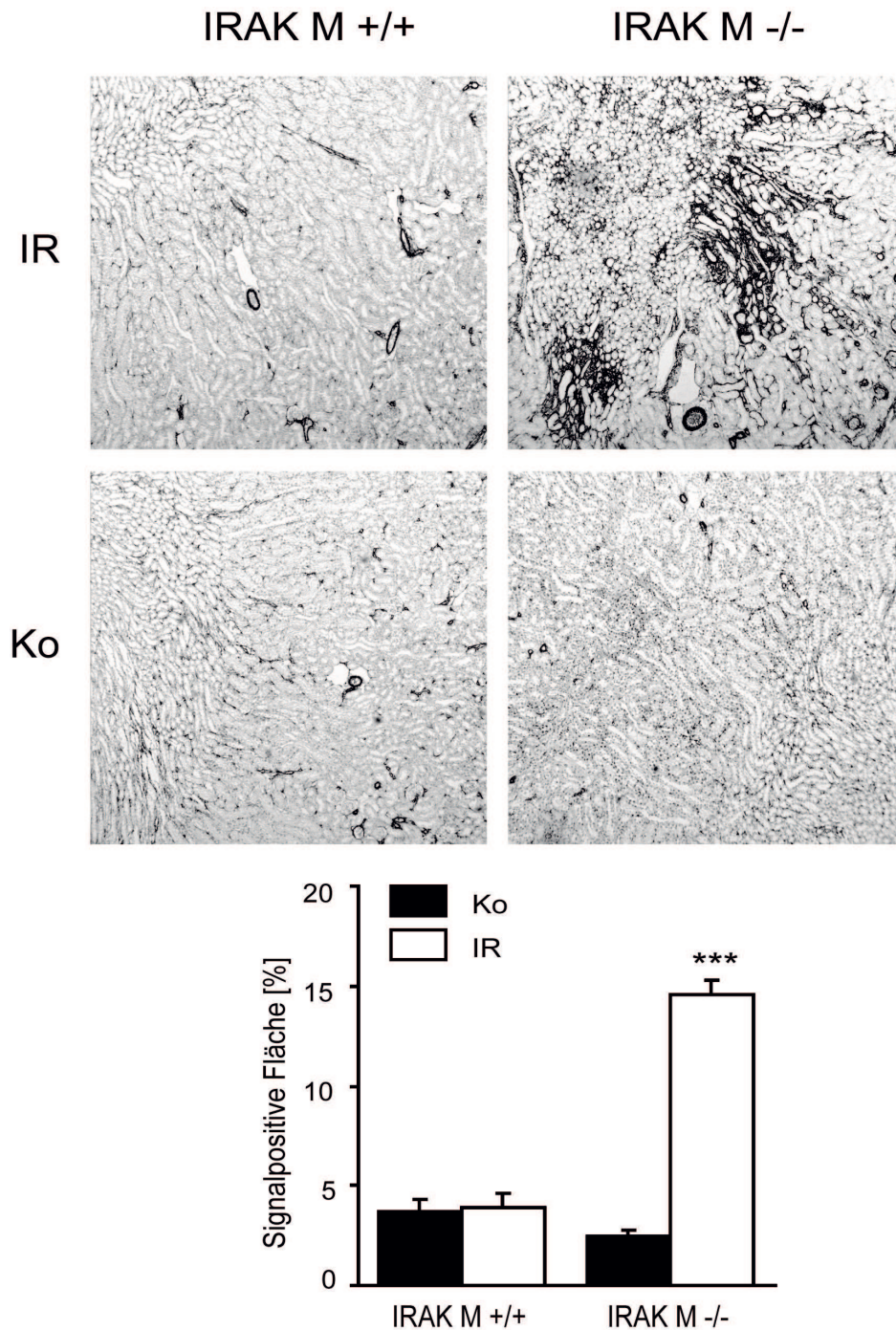
Durch den Mangel an IRAK M kommt es demnach, nach einem akuten Nierenversagens, zu einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix und der progredienten Fibrosierung der postischämischen Nieren.





**Abbildung 20: Verstärkte Akkumulation extrazellulärer Matrix in der postischämischen Niere der IRAK M-defizienten Mäuse**

5 Wochen nach unilateraler Ischämie/Reperfusion für 45 Minuten wurden histologische Schnitte mit Masson Trichrom gefärbt. Extrazelluläre Matrix stellt sich grün-gräulich da. Die Auswertung erfolgte per Photoshop. Pro Niere wurden 5 Gesichtsfelder analysiert. Es zeigte sich in den postischämischen Nieren (IR) der IRAK M-defizienten Mäuse (IRAK M<sup>-/-</sup>) eine verstärkte Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Die Nieren des Wildtyps (IRAK M<sup>+/+</sup>) sowie die kontralateralen Nieren (Ko) beider Genotypen unterschieden sich nicht in ihrem Gehalt an extrazellulärer Matrix. Bildauschnitt 50x vergrößert. Die Daten sind angegeben, als Anteil der signalpositiven Fläche an der Gesamtquerschnittsfläche der Niere in Prozent als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0,01$  gegenüber dem Wildtyp.



**Abbildung 21: Verstärkte Akkumulation von  $\alpha$ -SMA in der postischämischen Niere der IRAK M-defizienten Mäuse**

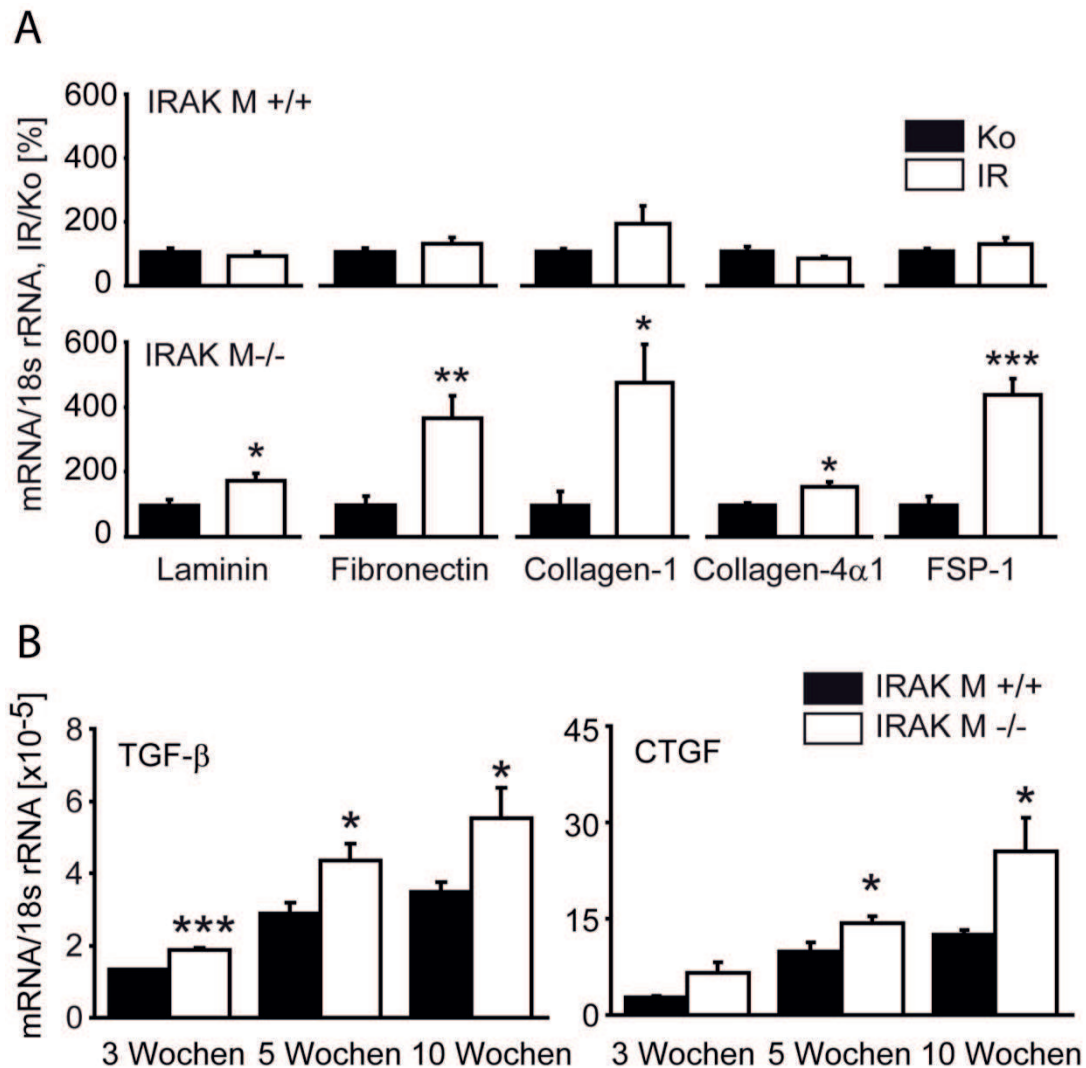
5 Wochen nach unilateraler IR, für 45 Minuten, wurden histologische Schnitte mit alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) gefärbt. Die Auswertung erfolgte per Fotoshop. Es wurden pro Niere 5 Gesichtsfelder analysiert. Der Bildausschnitt ist 50x vergrößert. Es zeigte sich in den postischämischen Nieren (IR) der IRAK M-defizienten Mäusen (IRAK M -/-) mehr  $\alpha$ -SMA positive Fläche. Die Nieren des Wildtyps (IRAK M +/+), sowie die kontralateralen Nieren (Ko) beider Genotypen unterschieden sich nicht. Die Daten sind angegeben, als Anteil der signalpositiven, schwarzen Fläche an der Gesamtquerschnittsfläche der Niere in Prozent, als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\*p < 0,001 gegenüber dem Wildtyp.



### **3.5.6 Verstärkte Produktion profibrotischer Marker durch den Mangel an IRAK M**

Zur weiteren Charakterisierung der atrophischen Nieren, wurde als Nächstes die mRNA aus den Nieren der operierten Wildtyp-Mäuse und IRAK M-defizienten Mäuse isoliert und hinsichtlich profibrotischer Marker untersucht. Die mRNA wurde in cDNA umbeschrieben und mittels RT-PCR quantifiziert. Der Mangel an IRAK M führte in den postischämischen Nieren, im Vergleich zu den dazugehörigen kontralateralen Nieren, zu der signifikant erhöhten Expression von Fibrose-typischen Markern, wie Laminin, Fibronectin, Collagen 1, Collagen IV $\alpha$ 1 und *fibroblast-specific protein 1* (FSP-1). Im Wildtyp wiesen die postischämischen und kontralateralen Nieren dieselben Mengen an profibrotischen Markern auf. Dies zeigte, dass es nur in der operierten Niere, der IRAK M-defizienten Mäuse, durch den Mangel an IRAK M zu einer Induktion dieser für intestitielle Fibrose typischen Molekülen gekommen ist.

Um einen besseren Überblick über den zeitlichen Ablauf der Fibrose-Entwicklung zu bekommen, wurde die mRNA von zwei weiteren Fibrosemarkern, TGF- $\beta$  und CTGF, in den postischämischen Nieren, 3, 5 und 10 Wochen nach der unilateralen Ischämie/Reperfusion quantifiziert. Bereits 3 Wochen nach der Operation zeigten sich signifikant höhere Mengen an TGF- $\beta$  mRNA in der operierten Niere der IRAK M-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp. Nach 5- und 10-wöchiger Reperfusionszeit war neben TGF- $\beta$ , auch CTGF in den IRAK M-defizienten Mäusen signifikant erhöht. Durch das Fehlen von IRAK M kommt es in den postischämischen Nieren zu einer progredienten Produktion von profibrotischen Mediatoren. Dies führte neben der tubulären Atrophie zu einer vermehrten Akkumulation von extrazellulärer Matrix und der Ausbildung eines chronischen Nierenversagens.

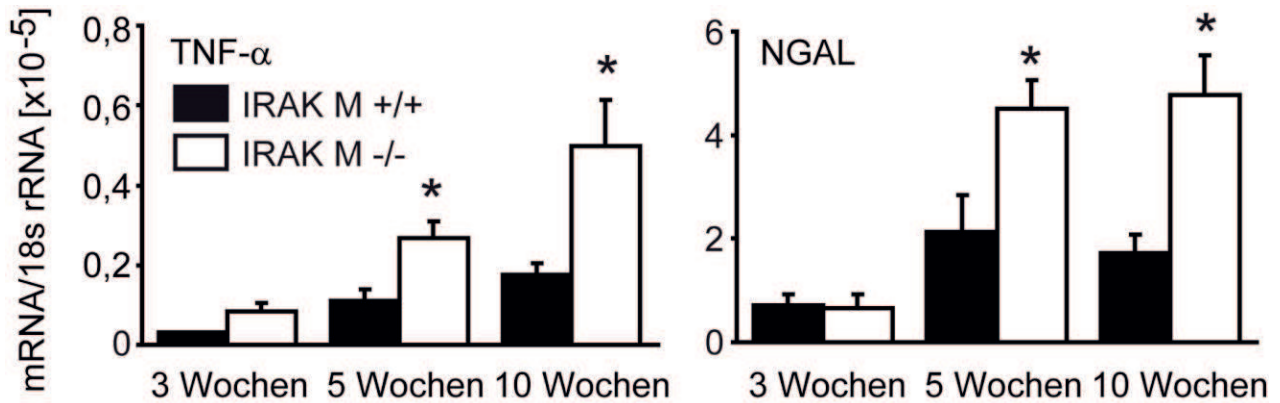


**Abbildung 22: Induktion profibrotischer Marker in der postischämischen Niere der IRAK-defizienten Mäuse**

**A.** Aus Wildtyp-Mäusen (IRAK M +/+) und IRAK M-defizienten Mäusen (IRAK M -/-) wurde 5 Wochen nach 45-minütiger Ischämie/Reperfusion mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR quantifiziert. Es zeigte sich eine signifikante Induktion Fibrose-spezifischer mRNA, in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse, nicht jedoch im Wildtyp. Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM von mindestens 3 Mäusen pro Gruppe dar. Die spezifische mRNA/18s rRNA der kontralateralen Niere ist angegeben als 100 %. Die spezifische mRNA/18s rRNA der postischämischen Niere ist als Abweichung davon in Prozent angegeben. **B.** Aus Nieren von Wildtyp-Mäusen und IRAK M-defizienten Mäusen nach unilateraler Ischämie/Reperfusion mit 45-minütiger Ischämie wurde nach 3, 5 und 10 Wochen die mRNA für TGF- $\beta$  und CTGF mittels RT-PCR quantifiziert. Es zeigten sich signifikant höhere Werte in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse. Daten dargestellt als Mittelwert der spezifischen mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### **3.6 Persistente Entzündung in den atrophischen Nieren durch die IRAK M Defizienz**

Wie bereits erwähnt, unterscheiden sich die Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse in der initialen Phase des ANV nicht von den Nieren der Wildtypkontrolle. Es kommt jedoch nur in den IRAK M-defizienten Tieren durch die Atrophie und die vermehrte Bildung von interstitieller Fibrose zur Entwicklung von Merkmalen eines chronischen Nierenversagens. Um dieses Phänomen weiter charakterisieren zu können, wurde zunächst nach Anzeichen einer chronischen Entzündungsreaktion in den postischämischen Nieren gesucht. Hierfür wurde die mRNA aus den postischämischen Nieren zum Zeitpunkt von 3, 5 und 10 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion auf proinflammatorische Marker untersucht. Die mittels RT-PCR quantifizierten Werte der mRNA von TNF- $\alpha$  und NGAL, zeigten nach 3 Wochen Reperfusion keine signifikanten Unterschiede zwischen der postischämischen Wildtypniere und der Niere der IRAK M-defizienten Mäuse. 5 und 10 Wochen nach der Operation war die mRNA-Expression des proinflammatorischen Markers TNF- $\alpha$  und des Markers für tubuläre Schädigung NGAL, in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse jedoch signifikant höher, als in der postischämischen Nieren des Wildtyps. Dies zeigte, dass der Mangel an IRAK M zu einer progredienten Entzündungsreaktion in der Niere führt und eine Ausheilung des akuten Nierenversagens verhindert. IRAK M ist demnach wichtig in der Regenerationsphase, es verhindert in den Wildtypnieren das Fortbestehen der Entzündungsreaktion nach dem ANV und damit die Ausbildung eines chronischen Nierenschadens.



**Abbildung 23: Ansteigende Entzündungsparameter in den IRAK M-defizienten Nieren**

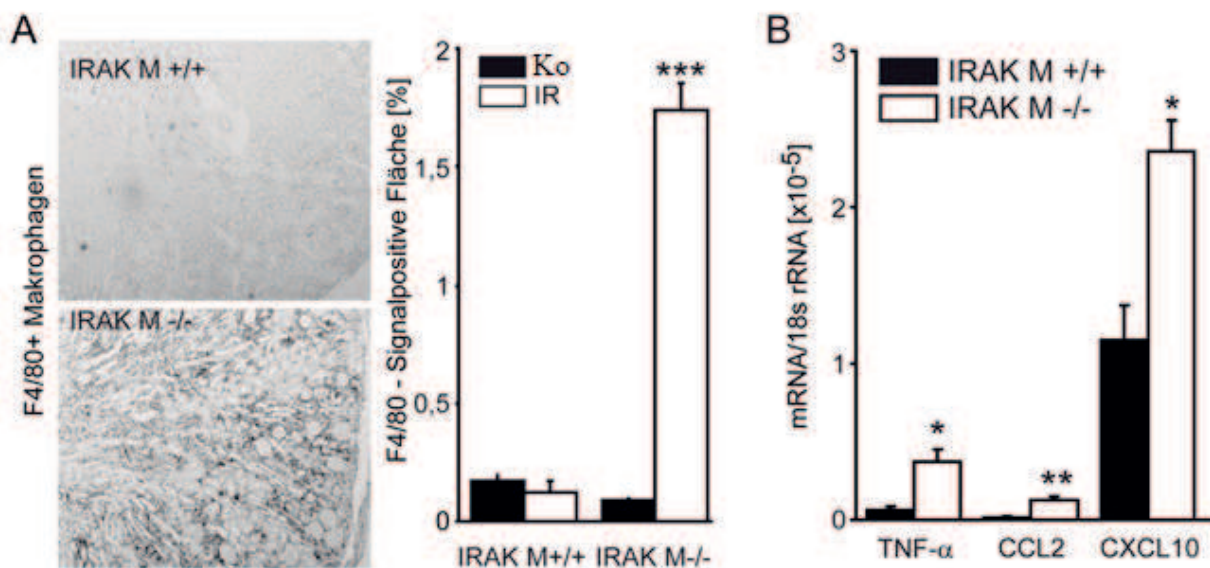
Aus postischämischen Nieren des Wildtyps (IRAK M $+/+$ ) und von IRAK M-defizienten Mäusen (IRAK M $-/-$ ) wurde mRNA isoliert und der Gehalt an spezifischer TNF- $\alpha$  und NGAL mRNA 3, 5 und 10 Wochen nach 45-minütiger Ischämie/Reperfusion quantifiziert. 3 Wochen nach IR zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout. 5 und 10 Wochen nach der Operation zeigte sich jedoch signifikant mehr TNF- $\alpha$  und NGAL in den Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse, im Vergleich zum Wildtyp. Daten dargestellt als Mittelwert der spezifischen mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  gegenüber dem Wildtyp.

### **3.7 Einfluss der IRAK M-Defizienz auf die Makrophagen**

#### **3.7.1 Vermehrte Invasion proinflammatorischer Makrophagen durch den IRAK M-Mangel**

Aus den vorangegangenen Experimenten ging hervor, dass IRAK M vor allen in CD11b+ Immunzellen, zu welchen die Makrophagen zählen, exprimiert wird. Deshalb wurde zunächst die Anzahl der Makrophagen in den postischämischen Nieren, mittels histologischer Schnitte in F4/80 Färbung und Auswertung durch Photoshop, quantifiziert. Hierfür wurden Schnitte aus Nierenproben der Wildtyp-Mäuse und IRAK M-defizienten Mäuse, 5 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion, verwendet. Die kontralateralen Nieren von Wildtyp-Mäusen und IRAK M-defizienten Mäusen zeigten beide die gleiche, niedrige Menge von Makrophagen. Die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse zeigten jedoch signifikant mehr Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp.

Nun da nachgewiesen wurde, dass in den IRAK M-defizienten Mäusen in der chronischen Phase nach dem akuten Nierenversagen mehr Makrophagen in der Niere vorhanden waren, wurden diese nun genauer auf ihre Differenzierung untersucht. Eine RT-PCR der mRNA aus den postischämischen Nieren, 5 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion, zeigte eine signifikant höhere Konzentration der für proinflammatorische M1 Makrophagen typischen Marker TNF $\alpha$ , CCL 2 und CXCL 10 in den IRAK M-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp.



**Abbildung 24: Vermehrte Infiltration von Makrophagen in die postischämie Niere der IRAK M-defizienten Mäuse**

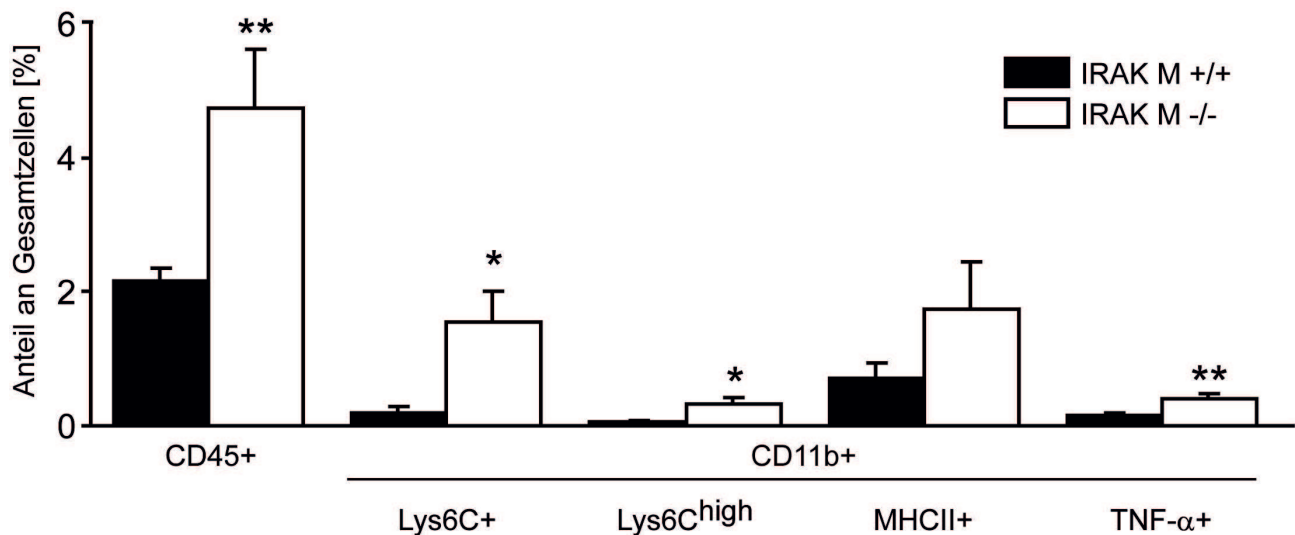
In Wildtyp-Mäusen (IRAK M +/+) und IRAK M-defizienten Mäusen (IRAK M -/-) wurde mittels 45-minütiger Ischämie/Reperfusion ein akutes Nierenversagen ausgelöst. 5 Wochen nach der Operation wurden die Nieren entnommen und untersucht. **A.** Färbung der Schnitte mit Makrophagen-spezifischer F4/80-Färbung. In den IRAK M-defizienten Nieren zeigten sich optisch mehr Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp. Die gezeigten Bildausschnitte sind in 50x Vergrößerung. **B.** Die Auswertung erfolgte mittels Photoshop Software, wie oben beschrieben. Wildtyp-Mäuse und IRAK M-defiziente Mäuse zeigten in der kontralateralen Niere (Ko) keinen Unterschied in ihrer Makrophageninfiltration. 5 Woche nach der OP fanden sich signifikant mehr F4/80+-Zellen in der Niere der IRAK M-defizienten Mäuse, als in der Wildtypniere. Daten dargestellt als Mittelwert der signalpositiven Fläche aus 5 Gesichtsfeldern pro Niere  $\pm$  SEM.

**C.** Die quantitative RT-PCR Analyse der mRNA aus postischämischen Nieren 5 Wochen nach der Operation, zeigt signifikant höhere Werte für TNF- $\alpha$ , CCL2 und CXCL10 in den IRAK M-defizienten Nieren im Vergleich zum Wildtyp. Daten dargestellt als spezifische mRNA/18s rRNA  $\pm$  SEM. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber dem Wildtyp.

### **3.7.2 Makrophagen durch IRAK M Defizienz in proinflammatorischem Zustand**

Zur genaueren Charakterisierung wurden die in den postischämischen Nieren enthaltenen Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die postischämische Niere der IRAK M-defizienten Mäuse besitzt keinen akuten Phänotyp, unterscheidet sich aber 5 Wochen nach der unilateralen Ischämie/Reperfusion signifikant von der Wildtypniere. Daher ist besonders der Zeitpunkt interessant, an dem es, durch das Fehlen von IRAK M in den Makrophagen, erstmals zu einer Abweichungen von den normalen Regenerationsprozessen kommt. Wir wählten als Entnahmezeitpunkt der Nieren für die FACS-Analyse, einen Zeitpunkt von 3 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion, da sich zu diesem Zeitpunkt die entzündlichen Marker in Wildtyp-Nieren und IRAK M-defizienten Nieren, noch nicht signifikant unterschieden haben (siehe Experiment 3.6). Ab diesem Zeitpunkt vermuteten wir, dass es durch das Fehlen von IRAK M, zu einem veränderten Aktivierungszustand der Makrophagen in den Knockout-Mäusen kommt. Dies würden die Unterschiede im Phänotyp zwischen Wildtyp-Nieren und IRAK M-defizienten Nieren 5 Wochen nach dem ANV erklären.

Es wurden Wildtyp-Mäuse und IRAK M-defiziente Mäuse einer unilateralen Ischämie/Reperfusion unterzogen und die Nieren nach 3 Wochen entnommen. Die Nieren wurden wie im Methodenteil beschrieben entnommen und weiter verarbeitet. Die in der Niere enthaltenen Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie anhand ihrer Oberflächenantigene genauer differenziert. Als Marker zur Identifizierung der Leukozyten wurde CD45 verwendet. Hierbei zeigte sich, dass die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse einen signifikant höheren Anteil an Leukozyten aufwiesen im Vergleich zum Wildtyp. Zur genaueren Charakterisierung der Leukozyten wurde CD11b verwendet, ein Oberflächenantigen, welches vor allem von Makrophagen exprimiert wird. Die Population der CD11b<sup>+</sup> Zellen wurde mittels eines zweiten Oberflächenantigens weiter unterteilt. Hierbei ergab sich in den IRAK M-defizienten Nieren, ein signifikant höherer Anteil der CD11b/Lys6C<sup>high</sup>-doppeltpositiven Zellen, sowie der CD11b/TNF $\alpha$ -doppeltpositiven Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Diese beiden Subpopulationen repräsentieren den klassisch aktivierten proinflammatorischen Makrophagenphänotyp M1.



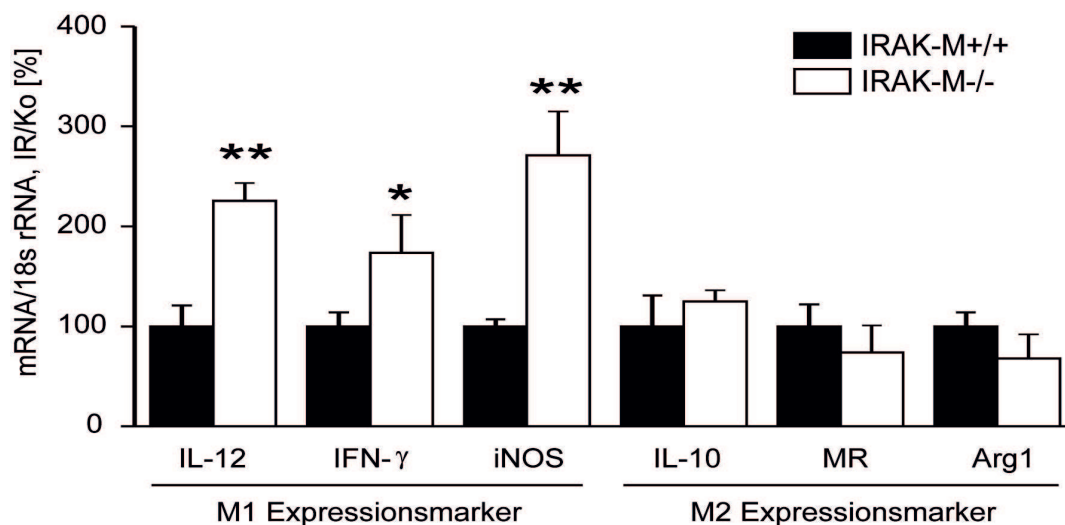
**Abbildung 25: Erhöhter Anteil an Leukozyten und proinflammatorischen M1 Makrophagen in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse**

3 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion wurden die gesamten Zellen der postischämischen Nieren aus Wildtyp-Mäusen (IRAK M +/+) und IRAK M-defizienten Mäusen (IRAK M -/-) mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Die Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse enthielten signifikant mehr CD45+ Zellen als der Wildtyp. Die Fraktion der CD11b+ Zellen wurde mit Hilfe weiterer Oberflächenmarker genauer unterteilt. Es zeigte sich hierbei eine erhöhte Fraktion der Lys6C+, Lys6C<sup>high</sup> und der TNF-α positiven Zellen. Daten dargestellt als Mittelwert ± SEM. \* p<0,05, \*\*p<0,01 gegenüber Wildtyp.



### 3.7.3 Vermehrte Induktion von M1- nicht aber von M2-typischen Markern in Makrophagen durch die IRAK M-Defizienz

Anschließend wurden weitere M1- und M2-spezifische Marker mittels einer mRNA Analyse quantifiziert um den Aktivierungsgrad der Makrophagen weiter charakterisieren zu können. Hierfür wurden die CD11b<sup>+</sup> Makrophagen mittels MACS-Beads, 3 Wochen nach unilateraler Ischämie/Reperfusion, aus den postischämischen Nieren des Wildtyps und der IRAK M-defizienten Mäuse isoliert. Aus den gewonnenen CD11b<sup>+</sup> Zellen wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR quantifiziert. Die CD11b<sup>+</sup> Zellen der IRAK M-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant vermehrte Expression der mRNA von IL-12, INF- $\gamma$  und iNOS. Die Moleküle sind Marker für den klassisch aktivierten M1 Makrophagen-Phänotyp. Die Marker für alternative aktivierte, antiinflammatorische M2 Makrophagen IL-10, MR und Arg1 waren in den IRAK M-defizienten Mäusen in vergleichbarer Höhe vorhanden wie im Wildtyp. Dies lässt darauf schließen, dass IRAK M den Aktivierungs- und Differenzierungsgrad von Makrophagen beeinflusst. Ohne IRAK M sind in den postischämischen Nieren mehr Makrophagen und diese vermehrt im proinflammatorischen M1 Phänotyp, als im alternativ aktivierten M2 Phänotyp.



**Abbildung 26: mRNA Expression von M1 und M2 typischen Markern in CD11b<sup>+</sup> Zellen aus postischämischen Nieren**

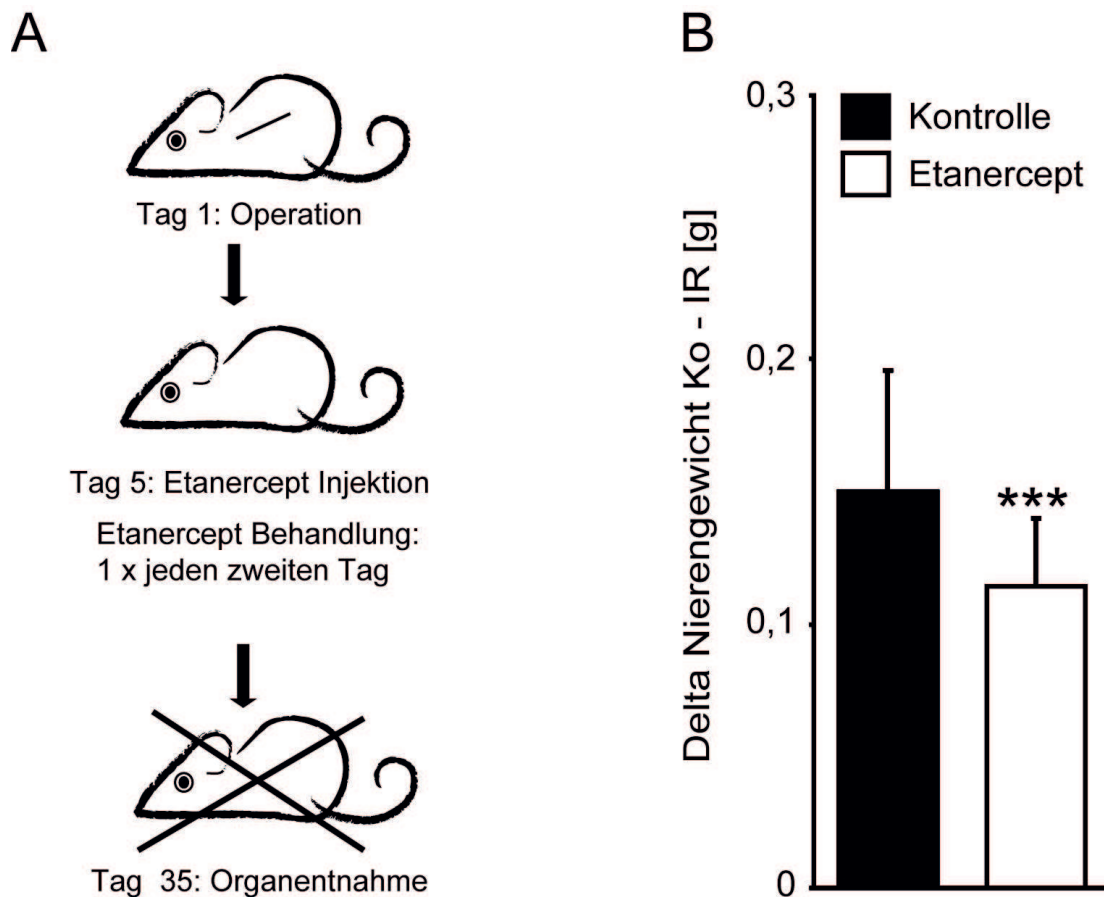
3 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion wurden mittels MACS-Beads CD11b<sup>+</sup> Zellen aus den postischämischen Nieren isoliert und die darin enthaltene mRNA mit quantitativer RT-PCR analysiert. Die CD11b<sup>+</sup> Zellen aus den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Expression an IL-12, INF- $\gamma$  und iNOS. Die Expression von IL-10, Mannose Rezeptor und Arginase 1 war in beiden Genotypen vergleichbar. Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die spezifische mRNA/18s rRNA der Wildtypnieren ist angegeben als 100 %. Die spezifische mRNA/18s rRNA der Niere der IRAK M-defizienten Mäuse ist als Abweichung davon in Prozent angegeben.  $p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .

### **3.8 TNF- $\alpha$ Blockade verbessert den Phänotyp der IRAK M defizienten Mäuse**

Es konnte nachgewiesen werden, dass durch den Verlust an IRAK M, vermehrt proinflammatorische M1 Makrophagen in den postischämischen Nieren vorkommen. Dadurch kommt es zu einem chronisch-auf-akuten Nierenversagen mit Bildung atropher Schrumpfnieren. Da diese Makrophagen unter anderen den proinflammatorischen Mediator TNF- $\alpha$  produzieren vermuteten wir, dass der Phänotyp der Schrumpfnieren durch eine Blockade der TNF- $\alpha$  Signaltransduktion aufgehoben oder zumindest verbessert werden kann.

Hierfür wurden IRAK M-defiziente Mäuse mittels unilateraler Ischämie/Reperfusion operiert und in zwei Gruppen eingeteilt. Die Therapiegruppe erhielt ab dem fünften postoperativen Tag 3 mal pro Woche eine intraperitoneale Injektion mit 10 mg/kg Etanercept. Der Kontrollgruppe wurden 100  $\mu$ l NaCl intraperitoneal injiziert. Therapie- und Kontrollgruppe wurden bis auf den Inhalt der Injektionsspitze identisch behandelt. Nach einer Reperfusionszeit von 5 Wochen wurden die Mäuse getötet und die Nieren entnommen. Die postischämischen Nieren waren in der Therapie- und in der Kontrollgruppe, im Vergleich zur gesunden kontralateralen Niere optisch verkleinert. Jedoch war dieser Substanzverlust in der Therapiegruppe geringer ausgeprägt. Die Analyse des Gewichtes zeigte, dass es durch die Gabe von Etanercept zu einem signifikant geringeren Gewichtsverlust, im Vergleich zur Kontrollgruppe, gekommen ist. Durch die Intervention mit Etanercept konnte der Phänotyp der Schrumpfnieren dementsprechend nicht komplett aufgehoben, aber verbessert werden.

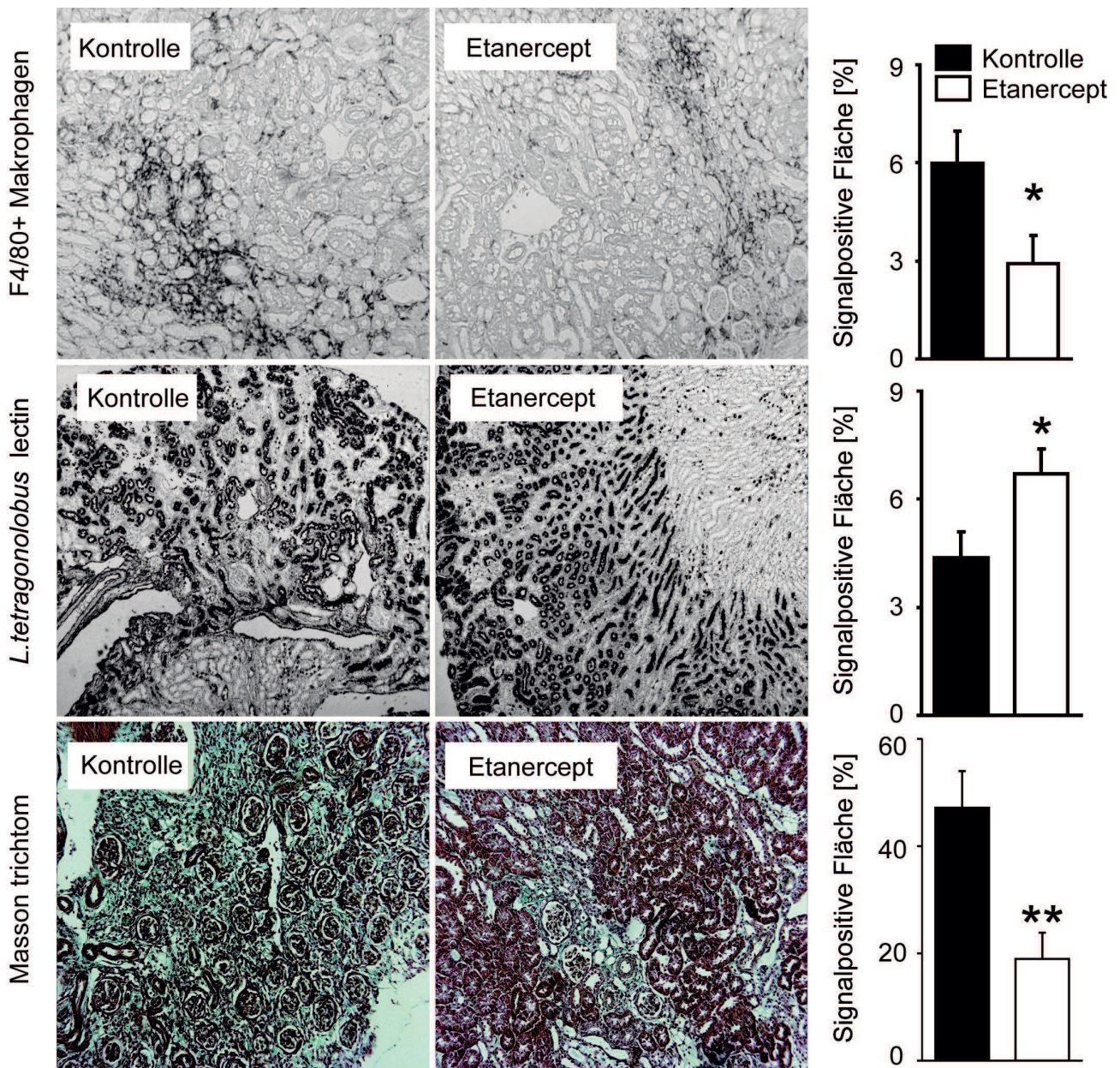
Aus den postischämischen Nieren wurden histologische Präparate angefertigt, mit F4/80, Masson Trichrom und Lotes tetragonolobus lectin angefärbt und wie bereits beschrieben, mit Photoshop ausgewertet. Die histologische Auswertung der postischämischen Nieren zeigte ebenfalls eine Verbesserung des Phänotyps durch die Etanercept-Therapie. Die F4/80 Färbung wies eine verminderte Anzahl an Makrophagen in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach. Durch die Masson Trichrom Färbung konnte gezeigt werden, dass die TNF- $\alpha$  Blockade zu einer verminderten Akkumulation von extrazellulärer Matrix in der Therapiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt hat. Im Experiment 3.5.2 wurde gezeigt, dass der Masseverlust der postischämischen Niere der IRAK M-defizienten Mäuse durch einen Verlust an Segmenten des proximalen Tubulussystems verursacht wird. In der Auswertung der mit L. tetragonolobus lectin gefärbten Schnitte war der Anteil der Signalpositiven Fläche an der Gesamtquerschnittsfläche der Niere in der Etanerceptgruppe signifikant höher. Durch die Blockade der TNF- $\alpha$  Signalübertragung konnte der Verlust an proximalen Tubuli und die vermehrte Fibrosierung der Niere signifikant reduziert werden.



**Abbildung 27: Geringere Ausprägung des chronischen Phänotyps in den IRAK M-defizienten Mäusen nach Etanerceptbehandlung.**

**A.** IRAK M-defiziente Mäuse wurden einer 45-minütigen unilateralen Ischämie/Reperfusion unterzogen. Ab dem fünften Tag nach der Operation wurde der Therapiegruppe 10 mg/kg Etanercept und der Kontrollgruppe NaCl intraperitoneal, 3 mal pro Woche, injiziert. Die Nieren wurden 5 Wochen nach der Operation entnommen und untersucht. **B.** Die postischämischen Nieren haben in der Kontroll- (schwarze Balken) und in der Therapiegruppe (weiße Balken) im Vergleich zur kontralateralen Niere an Gewicht verloren. Durch das Etanercept ist dieser Gewichtsverlust in der Therapiegruppe allerdings signifikant geringer, im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Nierengewicht dargestellt als Delta: Gewicht kontralaterale Niere - Gewicht postischämische Niere in Gramm. Daten dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber Kontrollgruppe.





**Abbildung 28: Lichtmikroskopische Auswertung der Etanercept-Therapie**

5 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion mit anschließender Etanercept-Therapie, wie oben beschrieben, wurden histologische Präparate aus den postischämischen Nieren angefertigt. Die F4/80 Färbung zeigte in der Kontrollgruppe eine vermehrte Invasion von Makrophagen im Vergleich zur Therapiegruppe. Mittels Lotus tetragonolobus lectin Färbung konnte gezeigt werden, dass in der Etanercept-Therapiegruppe mehr intakte, proximale Tubulussegmente erhalten werden konnten. Durch die Etanercept-Therapie konnte die Bildung von Fibrose vermindert werden, was an dem geringeren Gehalt grünlich gefärbter Fläche im Masson-Trichrom Präparat sichtbar wurde. Die quantitativen Analysen wurden mittels Photoshop in 50x Vergrößerung durchgeführt. Daten dargestellt als Mittelwert der Signalpositiven Fläche  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  gegenüber Kontrollgruppe.

# **Kapitel 4**

## **Diskussion**

## 4 Diskussion

Am Beginn dieser Arbeit stand die Hypothese, dass die IRAK M vermittelte Deaktivierung von proinflammatorischen Makrophagen für die Auflösung der renalen Entzündungsreaktion benötigt wird um damit eine vollständige Regeneration der Niere nach dem akuten Nierenversagen zu ermöglichen.

Zur Überprüfung der Hypothese verwendeten wir das Model der unilateralen Ischämie/Reperfusion in Wildtyp-Mäusen und IRAK M-defizienten Mäusen. Wir induzierten ein ANV und untersuchten die Nieren zu verschiedenen Zeitpunkten bis hin zu 10 Wochen nach der Operation. Dabei charakterisierten wir den Phänotyp der beteiligten Makrophagen und die Auswirkung des IRAK M Verlustes auf die Entzündungs- und Regenerationsprozesse in den postischämischen Nieren.

Wir konnten zeigen, dass der Mangel an IRAK M zu einer anhaltenden Präsenz von proinflammatorischen Makrophagen führte, was die Entwicklung eines chronischen Nierenschadens mit tubulärer Atrophie, einer erhöhten Dichte atubulärer Glomeruli und einer Akkumulation von extrazellulärer Matrix zur Folge hatte. Typische Kennzeichen einer chronischen Nierenschädigung sind eine chronische renale Entzündung, interstitielle Fibrose und die tubuläre und vaskuläre Atrophie [51], was die Schlussfolgerung zulässt, dass es in den von uns operierten IRAK M-defizienten Mäusen zu einem chronisch-auf-akuten Nierenversagen gekommen ist. Wir konnten somit in einem experimentellen Tierversuch einen kausalen Zusammenhang zwischen dem ischämischen ANV und der nachfolgenden Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz herstellen. Damit konnte gezeigt werden, dass die Makrophagen-vermittelte Entzündung ein wichtiger Bestandteil in dessen Pathogenese ist.

### 4.1 Entzündung als Teil der Pathogenese des chronisch-auf-akuten Nierenversagens

Der genaue Pathomechanismus hinter der Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens ist bisher noch weitestgehend unklar. Die chronisch-insuffizienten Nieren der von uns operierten IRAK M-defizienten Mäuse waren verkleinert und hatten 5 Wochen nach dem akuten Nierenversagen im Vergleich zu den gesunden Wildtypnieren signifikant an Gewicht verloren. Zudem konnten wir einen signifikanten Verlust an proximalen Tubulussegmenten und die vermehrte Bildung atubulärer Glomeruli nachweisen. Als mögliche Ursache für den Verlust der Tubuluszellen fanden wir eine verminderte Proliferation verbliebener Tubuluszellen in den IRAK M-defizienten, pos-

tischämien Nieren. Verantwortlich für die Schrumpfnierenbildung war demnach nicht der Verlust von Glomeruli, sondern der Verlust von tubulären Segmenten durch eine verminderte Proliferation der verbliebenen Tubuluszellen.

In Übereinstimmung zu unseren Daten zeigten auch Ko et al. in einem Model der unilateralen Nephrektomie mit kontralateraler Ischämie/Reperfusion, dass es nach einem akuten ischämischen Nierenversagen zu der Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung kommt. Die Ratten entwickelten 4 bzw. 8 Wochen nach der Ischämie/Reperfusion eine chronische Niereninsuffizienz mit erhöhten Retentionsparametern, tubulärer Atrophie, interstitieller Fibrosierung, einer erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine und einer persistierenden Infiltration von Makrophagen. Eine systemische Depletion der Makrophagen ab Tag 3 nach der Operation mittels *Liposome Clodronate* verbesserte den Phänotyp und reduzierte die Ausprägung der chronischen Nierenschädigung [73]. Dies zeigt in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, dass die beteiligte Entzündungsreaktion einen Anteil an der Entwicklung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens hat und dass Makrophagen dabei wichtige Vermittler sind. Als eine weitere Ursache für die Entwicklung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens wird die vaskuläre Atrophie diskutiert. So zeigten Basile et al., dass es in Rattennieren nach einem ischämischen ANV, im Verlauf von 40 Wochen, zu einer Abnahme der Dichte peritubulärer Kapillaren im inneren Streifen der äußeren Medulla gekommen war. Dies war assoziiert mit Proteinurie und dem vermehrten Auftreten von tubulointerstitieller Fibrose [74]. Die verminderte Anzahl von Blutgefäßen führt zur chronischen Hypoxie, was eine nachfolgende Entzündungsreaktion auslösen kann [33].

Die Möglichkeiten der Regeneration nach einer akuten Nierenschädigung sind weitestgehend auf den tubulären Anteil der Nephrone beschränkt, da Podozyten beim Erwachsenen nur eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit besitzen und somit eine Reparatur der Glomeruli limitiert ist [75]. Pactalunan et al. fanden in einer histologischen Studie, 20 Wochen nach unilateraler Ischämie/Reperfusion und kontralateraler Nephrektomie, vor allem Schäden im tubulären Kompartiment. Die Atrophie und zystische Dilatation tubulärer Segmente, sowie das vermehrte Auftreten von Glomeruli ohne Verbindung zum Tubulussystem, führte in den Ratten zu einer chronischen Nierenschädigung mit dauerhaft erniedrigter GFR und Proteinurie [76]. Wir konnten zeigen, dass es in den IRAK M-defizienten Mäusen vermehrt zu der Bildung atubulärer Glomeruli gekommen ist. Der Verlust funktioneller Nephrone und die Bildung atubulärer Glomeruli kommen auch in einer Vielzahl von anderen renalen Erkrankungen vor. Atubuläre Glomeruli wurden erstmalig 1935 in Mikrodissektionsstudien an Patientennieren mit *Bright's disease* entdeckt [77]. Seitdem wurde die glomerulo-tubuläre Diskonnektion in weiteren renalen Erkrankungen beschrieben [78]. Zum Beispiel sind 18 % der Glomeruli in Patienten mit chronischer Transplantatabstoßung atubulär [79].

Da die Wildtyp-Mäuse, bei den gleichen Operationsbedingungen, kein chronisch-auf-akutes Nierenversagen entwickelten, bleibt nur eine Ursache für die fehlerhafte Regeneration der proximalen Tubuluszellen in den IRAK M-defizienten Mäusen übrig: die verstärkte Entzündungsreaktion durch den Wegfall der IRAK M Funktion. Damit konnten wir zeigen, dass der Verlust von proximalen Tubulussegmenten ein Teil der Pathophysiologie des chronisch-auf-akuten Nierenversagens ist und dass dieser Prozess von einer persistenten Entzündungsreaktion vermittelt wird.

### 4.2 Einfluss von IRAK M auf die Entzündungsreaktion

In den IRAK M-defizienten Nieren kam es postoperativ zu einer anhaltend hohen Expression von TNF- $\alpha$  und NGAL, über einen Untersuchungszeitraum von 10 Wochen. Die untersuchten Makrophagen zeigten einen vermehrt proinflammatorischen M1 Phänotyp. Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch den Verlust von IRAK M zu einer persistenten Entzündungsreaktion in den postischämischen Nieren der IRAK M defizienten Mäuse gekommen ist.

IRAK M ist von Bedeutung in der Erhaltung der Homöostase und die IRAK M-Defizienz führt zu einer Vielzahl von Pathologien, welche assoziiert sind mit einer verstärkten chronischen Entzündungsreaktion. IRAK M wird im Gastrointestinaltrakt durch die normale Darmflora induziert, was zu der Toleranz des Immunsystems ihr gegenüber führt und zur intestinalen Homöostase beiträgt. So führt die IRAK M-Defizienz in dem Kolitis-Modell in IL-10-defizienten Mäusen zu einer chronischen Entzündungsreaktion mit der vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine und einer früheren und stärkeren Ausprägung der Kolitis [80]. Balaci et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen früh einsetzendem Asthma und einer Mutation im humanen IRAK M-Gen [81]. Die IRAK M-Defizienz ist des weiteren assoziiert mit einer erhöhten Autoimmunität, wie zum Beispiel im Rahmen des systemischen Lupus erythematoses [47]. Tan et al. zeigten, dass IRAK M-defiziente *nonobese diabetic* (NOD) Mäuse früher einen Typ 1 Diabetes mellitus entwickeln und dieser schneller fortschreitet. Die Antigenpräsentierenden Zellen, zu welchen Makrophagen gehören, zeigten dabei eine verstärkte Aktivität und die erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokine [82]. Die Deaktivierung von proinflammatorischen Makrophagen durch IRAK M ist außerdem ein Bestandteil in der Entwicklung der Endotoxintoleranz und der relativen Immunsuppression im Rahmen einer Sepsis [45, 46].

Wir konnten zeigen, dass die IRAK M-defizienten Mäuse ein chronisch-auf-akutes Nierenversagen entwickelt haben. Daraus schließen wir, dass die Deaktivierung proinflammatorischer Makrophagen auch im Rahmen des ANV benötigt wird, um eine chronische Entzündungsreaktion zu verhindern



und eine Heilung des Gewebes zu ermöglichen. Die TLR-vermittelte Expression von IRAK M führt zu einer aktiven Inhibition der Entzündungsantwort. Bereits für andere Gene konnte gezeigt werden, dass die Auflösung der renalen Entzündungsreaktion ein aktiver Prozess ist, welcher die Induktion von regulatorischen Genen benötigt. *Interferon regulatory factor 4* (IRF 4), eine weiterer negativer Regulator der TLR-Signalübertragung, wird ebenfalls durch einen Ischämie/Reperfusionsschaden in der Niere induziert und bewirkt eine Deaktivierung renaler dendritischer Zellen. Ohne diese aktive Auflösung der Entzündungsreaktion kommt es in INF 4-defizienten Mäusen zu einer verstärkten Ausprägung der akuten Nierenschädigung mit größeren Parenchymschäden und einer verschlechterten Nierenfunktion [83]. Auch *single Ig IL-1 receptor-related protein* (SIGIRR) inhibiert die TLR-Signalübertragung. SIGIRR führt im Rahmen des ANV zu einer Deaktivierung von dendritischen Zellen und ist damit an einer Auflösung der Entzündungsreaktion beteiligt. Ähnlich wie IRF 4-defiziente Mäuse zeigen auch SIGIRR-defiziente Mäuse, nach Induktion eines Ischämie/Reperfusionsschadens, eine verstärkte Nierenschädigung mit vermehrt vorkommenden proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und einer vermehrten tubulären Schädigung [84]. Diese beiden Faktoren werden hauptsächlich in dendritischen Zellen exprimiert, welche die Entzündung in einer frühen Phase des ANV vermitteln [85]. IRAK M wird vor allem in Makrophagen exprimiert, welche in der Regenerationsphase das Ausmaß der Entzündungsreaktion bestimmen. Damit hat dieser negative Regulator einen größeren Einfluss auf die Heilung nach dem akuten Nierenversagen. [51]. Die Auflösung der renalen Entzündungsreaktion ist demnach kein passiver sondern ein aktiver Prozess, welcher zur Deaktivierung von proinflammatorischen Makrophagen die Induktion von regulatorischen Genen wie IRAK M benötigt. Die IRAK M-Defizienz führt demnach zu einer chronischen Entzündungsreaktion in der Niere.

### 4.3 Einfluss proinflammatorischer Makrophagen auf die Wundheilung

Jede Art von Verletzung führt zu einer Reihe von Reaktionen des Gewebes, welche den Schaden begrenzen und die Homöostase wiederherstellen sollen [55]. Als Model für Heilung im Allgemeinen wird oft die kutane Wundheilung verwendet. Es werden dabei verschiedene, sich überlappende Phasen unterschieden. (1) Eine Entzündungsphase, in welcher es zur Rekrutierung von Immunzellen kommt, welche proinflammatorische Zytokine, Chemokine und ROS produzieren, Pathogene eliminieren und nekrotische Zellen entfernen. (2) Eine proliferative Phase, mit der Proliferation und Aktivierung von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen und der

damit verbundenen Re-Epithelialisierung, Neoangiogenese und der Produktion von einer provisorischen, extrazellulären Matrix zur Unterstützung des Gewebes. (3) Einer Phase der Auflösung, in welcher die Entzündungsreaktion beendet wird und es zur Wiederherstellung der Integrität des Gewebes kommt [86]. Diese schnell wirksamen Reaktionen zur Gefahrenkontrolle nach einer Gewebeschädigung sind evolutionär selektiert und dienen dem Überleben des Organismus in einer feindlichen Umgebung. Es kann jedoch auch, als Ergebnis des Reparaturprozesses, zu der unkontrollierten und exzessiven Bildung von extrazellulärer Matrix mit der Fibrosierung des Gewebes kommen. Dies kann zu dem Verlust der für die Funktion wichtigen Gewebestrukturen führen [87]. Nur in den frühesten embryonalen Stadien kommt es zu einer narbenlosen Wundheilung ohne die Entwicklung von Fibrose und ohne eine begleitende Immunreaktion. Gründe hierfür sind die noch ausstehende Entwicklung der Immun-Zelllinien oder die fehlende Rekrutierung von Makrophagen in die Wundregion [88]. Nach dieser Zeit ist der Reparaturprozess immer mit einem Entzündungsprozess verbunden und die unkontrollierte Progression der Entzündung führt zur fortschreitenden Fibrosierung und letztlich zum Verlust der Organfunktion [89].

Wir konnten zeigen, dass es durch die fehlende Wirkung von IRAK M zu einer Persistenz von proinflammatorischen M1 Makrophagen in den postischämischen Nieren bekommen ist, was eine chronische Entzündungsreaktion vermittelte und zu einer verminderten Heilung des Gewebes mit tubulärer Atrophie und der Bildung von interstitieller Fibrose geführt hat. Die Therapie mit Etanercept bewirkte eine Blockade der proinflammatorischen und proapoptischen Effekte von TNF- $\alpha$ , einem Hauptprodukt der M1 Makrophagen. Dies limitierte die Entzündungsreaktion und verbesserte dadurch den chronischen Phänotyp in den IRAK M-defizienten Mäusen.

Dass eine persistente Makrophagen-vermittelte Inflammation zu der Beeinträchtigung der Geweberegeneration führt, konnte auch für die kutane Heilung gezeigt werden. Ein Kennzeichen für chronisch venöse Ulcera ist eine persistierende Entzündungsphase. Sindrilaru et al. zeigten in einem Modell für chronisch venöse Ulcera, dass es durch die exzessive Akkumulation von Eisen in Makrophagen zu einem permanenten proinflammatorischen M1-ähnlichen Phänotyp kommt. Diese durch Eisen induzierte Aktivierung der proinflammatorischen Makrophagen führte zu vermehrten DNA-Schäden und dem vorzeitigen Altern der residenten Hautfibroblasten, was die Heilung der Haut beeinträchtigte. Eine therapeutische TNF- $\alpha$  Blockade mit Etanercept verbesserte den Phänotyp und beschleunigte die Wundheilung [90].

#### 4.4 Ursache der Fibrose im chronisch-auf-akuten Nierenversagen

Wir fanden in den atrophischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse signifikant höhere Mengen an profibrotischen Markern wie TGF- $\beta$  und CTGF und eine verstärkte Fibrosierung im Vergleich zum Wildtyp. Unabhängig von der auslösenden Ätiologie ist ein gemeinsames Kennzeichen chronischer Nierenerkrankungen eine progressive Fibrosierung mit der finalen Konsequenz des terminalen Nierenversagens [89]. Zu klären ist nun die richtige Reihenfolge von renaler Entzündung und interstitieller Fibrose und ob die übermäßige Produktion von extrazellulärer Matrix aktiv die progressive Niereninsuffizienz fördert oder nur begleitend dazu vorkommt; ein „Henne-Ei-Problem“. Viel diskutiert wurde in diesem Zusammenhang die Funktion von Makrophagen in der Vermittlung von renaler Entzündung und Fibrose [51]. Makrophagen produzieren nach Kontakt mit IL-4 und IL-13 *in vitro* vermehrt profibrotische Mediatoren wie TGF- $\beta$  oder PDGF und Komponenten extrazellulärer Matrix, wie Fibronektin [50]. TGF- $\beta$  ist ein zentraler Mediator der Fibrose, unter anderen durch die Induktion einer vermehrten Proliferation von Myofibroblasten und Fibroblasten und der erhöhten Produktion von extrazellulärer Matrix [91]. Deshalb werden M2 Makrophagen von manchen Autoren als Vermittler für eine progrediente Fibrosierung gesehen [92]. Wir konnten zeigen, dass die atrophischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse und die gesunden Nieren des Wildtyps keine Unterschiede in der Expression von M2 Makrophagen-typischen Markern aufwiesen. Demnach befanden in den IRAK M-defizienten Nieren dieselben Mengen an alternativ aktivierten M2 Makrophagen wie in den gesunden Nieren. Dies weist darauf hin, dass die vermehrte Fibrosierung der Schrumpfnieren nicht durch M2 Makrophagen verursacht worden ist. Wahrscheinlicher ist eine andere Erklärung für die Entwicklung der Fibrose in den IRAK M-defizienten Mäusen: Durch das vermehrte Vorkommen proinflammatorischer M1 Makrophagen kam es zu einer verstärkten Entzündung in den postischämischen Nieren, was zu einer fehlenden Proliferation des verletzten Epithels führte. Ein wichtiger Bestandteil der Regeneration nach einem ANV ist die Fähigkeit der überlebenden tubulären Epithelzellen die verloren gegangenen Zellen durch Proliferation zu ersetzen [93]. Da die Regeneration der Niere aufgrund der insuffizienten epithelialen Heilung und der anhaltenden Entzündung nicht möglich war, kam es zu einer Defekt-Reparatur mit mesenchymaler Heilung (Fibrose), um die Wundfläche zu verkleinern und das Gewebe zu stabilisieren [55].

Yang et al. zeigten, dass es nach unilateraler Ischämie/Reperfusion, durch einen Arrest der proximalen Tubulusepithelzellen im G2/M Stadium des Zellzyklus, anstelle der normalen Reparatur, zu einer vermehrten Produktion der profibrotischen Wachstumsfaktoren TGF- $\beta$  und CTGF gekommen ist. Dies förderte die Proliferation von Fibroblasten und dadurch die vermehrte

Produktion von extrazellulärer Matrix mit einer progredienten Fibrosierung der Nieren [94].

Ursächlich für das chronisch-auf-akuten Nierenversagen ist nach unseren Daten nicht eine M2 Makrophagen-vermittelte Fibrosierung der Niere, sondern die M1 Makrophagen-vermittelte anhaltende Entzündungsreaktion, welche eine tubuläre Heilung verhindert und so sekundär zur Bildung einer interstitieller Fibrose führt. Dies zeigten auch andere Autoren. Wang et al. programmierten Makrophagen ex vivo, injizierten sie in Mäuse mit Adrimycin-induzierten ANV und bestimmten vier Wochen später den Grad der Fibrosierung. M1 programmierte Makrophagen führten zu stärkeren Parenchymschäden und der vermehrten Akkumulation von extrazellulärer Matrix, wohingegen die M2 Makrophagen in den Nieren die Schäden verminderten und zu einer geringeren Fibrosierung führten [62]. Unsere Daten unterstützen somit das Konzept des Nephronenverlustes. Durch das unter Anderen von TNF- $\alpha$  vermittelte Absterben der Tubuluszellen kommt es zur Atrophie der Nephrone mit Bildung von atubulären Glomeruli. Die Fibrose entsteht als Prozess sekundärer Wundheilung, um die intakten Nephrone zu stabilisieren und weitere Schäden zu verhindern. Ein evolutionär konserviertes Konzept, wie es zum Nutzen des Organerhaltes auch in anderen Körperstrukturen verwendet wird.

### **4.5 Risikofaktoren für die Entwicklung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens**

Wir konnten zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Stärke der akuten Nierenschädigung und der Progression hin zu einer chronischen Nierenschädigung gibt. Eine 20- und 45-minütige Ischämiezeit hatte in den Wildtyp-Mäusen keine Auswirkungen auf das Langzeitergebnis, weil der initiale Schaden nicht groß genug war. Eine stärkere, akute Nierenschädigung hingegen, verursacht durch die längere Ischämiezeit von 90 und 120 Minuten, führte zu der Entwicklung von Schrumpfnieren. Es konnte in Studien bereits gezeigt werden, dass ein Zusammenhang besteht zwischen der Schwere der akuten Nierenschädigung und der Wahrscheinlichkeit später eine chronische Nierenschädigung zu entwickeln. Ishani et al. zeigten in einer Studie an Patienten nach einer Herzoperation, dass abhängig von der Höhe des postoperativen Kreatininanstiegs, das Risiko für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz und das Risiko für die Progression einer vorhandenen Niereninsuffizienz zugenommen hat [95]. Chawla et al. untersuchten Patienten mit einem akutem Nierenversagen in den RIFLE Stadien R bis F und zeigten, dass die Intensität des ANV assoziiert war, mit der Progression zu einem fortgeschrittenen Nierenversagen. Dabei hatten Patienten mit einer vorübergehenden Dialysepflicht ein wesentlich

höheres Risiko für die Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung, als Patienten mit einer milderer Ausprägung des akuten Nierenversagens [96].

Die IRAK M defizienten Mäuse entwickelten nach einem operativ induzierten ischämischen akuten Nierenversagen eine chronische Nierenschädigung, wohingegen die Wildtyp-Mäuse bei gleicher Behandlung keine Langzeitschäden aufwiesen. Damit wurde die IRAK M Defizienz in dieser Arbeit als ein potentieller, unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens identifiziert. Die Behandlung von Patienten entwickelt sich in Zukunft immer mehr in Richtung einer individualisierten Therapie. In diesem Zusammenhang kann durch ein genetisches Screening eine IRAK M Defizienz in Risikopatienten identifiziert werden. Die betroffenen Patienten könnten dann, im Falle eines akuten Nierenversagens engmaschig überwacht werden, um eine Progression zu einem chronischen Nierenversagen zu verhindern. Mögliche Vorgehensweisen wären: die optimale Einstellung des Blutdrucks, eine Vermeidung von nephrotoxischen Substanzen und die Einstellung einer salz- und proteinarmen Ernährung, wie sie für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz empfohlen wird [31].

Für die Zukunft ist es zudem sinnvoll, nach weiteren Risikofaktoren für die Entwicklung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens zu suchen, um den betroffenen Patienten eine bessere Nachsorge anbieten und eine chronische Nierenschädigung verhindern zu können.

### **4.6 Mögliche Therapieansätze für das chronisch-auf-akute Nierenversagen**

Wir vermuteten, dass eine TNF- $\alpha$  Blockade einen positiven Effekt auf unser Langzeitmodell hat, da die Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse große Mengen an TNF- $\alpha$  aufwiesen. Die Entwicklung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens in den IRAK M-defizienten Mäusen konnte durch die therapeutische Blockade der biologischen Wirkung von TNF- $\alpha$  verbessert werden. Die mit Etanercept behandelten Mäuse zeigten einen signifikant geringeren Gewichtsverlust, weniger infiltrierte Makrophagen, einen geringeren Verlust proximaler Tubulussegmente und einen niedrigeren Gehalt an interstitieller Fibrose. Zwar konnte die Etanercept-Therapie das chronisch-auf-akute Nierenversagen nicht komplett verhindern, dafür aber den Phänotyp signifikant mildern. Eine Anti-TNF  $\alpha$ -Therapie mit Etanercept zeigt gute Effekte in chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Psoriasis [97, 98]. Für das akute Nierenversagen konnte bereits ein protektiver Effekt der Etanercept-Therapie belegt werden. So zeigen IRF 4-defiziente Mäuse nach Ischämie/Reperfusion eine verstärkte akute Nierenschädigung im Vergleich zum Wildtyp, was durch die Therapie mit Etanercept aufgehoben werden konnte [83]. Das der

Phänotyp der chronischen Nierenschädigung in den IRAK M-defizienten Mäusen durch die Etanercept-Therapie nicht komplett aufgehoben werden konnte, liegt möglicherweise an den biologischen Eigenschaften von Etanercept. Die anti-TNF- $\alpha$  Antikörper Infliximab und Adalimumab können durch die Bindung von membrangebundenen TNF- $\alpha$  eine Apoptose in der Zelle auslösen, eine Funktion die Etanercept nicht hat. Proinflammatorische M1 Makrophagen exprimieren hohe Mengen an membranständigen TNF- $\alpha$  und Infliximab/Adalimumab sind in der Lage, diese Zellen durch die Induktion der Apoptose zu eliminieren. Aus diesem Grund sind Infliximab/Adalimumab, nicht aber Etanercept wirksam in der Therapie von Morbus Crohn [99]. In unserem Model des chronisch-auf-akuten Nierenversagens hob die Therapie mit Etanercept demnach nur die Wirkung von löslichem TNF- $\alpha$  auf. Möglicherweise könnte eine Therapie mit Infliximab/Adalimumab durch eine Apoptose in den auslösenden persistent-proinflammatorischen M1 Makrophagen den Phänotyp noch weiter reduzieren. IRAK M unterdrückt als ein negativer Regulator der TLR/IL-1R Signalübertragung die Transduktion von NF- $\kappa$ B. Wir konnten zeigen, dass die IRAK M Defizienz vermehrt zu der Entwicklung eines proinflammatorischen Phänotyps in den Makrophagen der postischämischen Niere geführt hat. Dass eine Inhibition von NF- $\kappa$ B die Entwicklung eines M1 Phänotyps unterdrückt und damit eine nachfolgende Schädigung der Niere vermindern kann, zeigten auch Wilson et al. in einem Model der neprotoxischen Nephritis in Ratten. Die Inhibition von NF- $\kappa$ B, mittels dominant-negativen I $\kappa$ B in *bone marrow-derived macrophages* (BMDM), führte zu einer verminderten Expression M1 typischer Marker, wie TNF- $\alpha$ , IL-12, iNOS und MHC II. Die Zellen synthetisierten dafür aber höhere Mengen an IL-10 und zeigten anti-inflammatorische Fähigkeiten, was in vivo zu einer Reduzierung des Nierenschadens führte [100]. Ranganathan et al. zeigten, dass *netrin-1*, welches unter anderen die Aktivierung von NF- $\kappa$ B reguliert, eine M2 Polarisierung in Makrophagen indiziert und die INF  $\gamma$  vermittelte M1 Polarisierung unterdrückt. Dies hatte einen protektiven Effekt auf den ischämischen Nierenschaden [101]. Die Beeinflussung der Aktivität von NF- $\kappa$ B und damit die genetische Alteration der Makrophagen-Polarisierung ist ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt in der Behandlung von chronisch-inflammatorischen Nierenerkrankungen. In der vorliegenden Arbeit konnten wir IRAK M als ein mögliches Zielgen identifizieren. Eine pharmakologische Induktion von IRAK M könnte durch die Deaktivierung proinflammatorischer Makrophagen möglicherweise ein therapeutisch wertvolles Werkzeug in der Behandlung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens darstellen. Auf jeden Fall dringend benötigt, wird die weitere Forschung auf dem Gebiet der Makrophagen-Polarisierung, um einen genaueren Einblick in die Pathogenese des chronisch-auf-akuten Nierenversagens zu erhalten und eventuelle Therapien zu entwickeln.

### 4.7 Limitationen und Grenzen der Arbeit

Das Wissen um die Pathogenese des akuten Nierenversagens stammt hauptsächlich aus Tierexperimenten. Dabei existiert eine Vielzahl von Modellen. Wir haben für diese Arbeit das Model der unilateralen Ischämie/Reperfusion in der Maus gewählt, da es vergleichsweise einfach in der Anwendung und gut reproduzierbar ist. Eine direkte Übertragung der gewonnenen Daten auf die Vorgänge im Menschen ist allerdings nur eingeschränkt möglich. Erstens ist die renale Struktur und Physiologie, sowie das Immunsystem in der Maus nicht exakt identisch zu der im Menschen. Die ermittelten Resultate im Mausmodel dienen hierbei, im Sinne einer Grundlagenforschung, als möglicher Ansatzpunkt für folgende Studien. Eine weitere Limitation der Arbeit liegt in dem Model selbst. In den vorliegenden Experimenten wurden gesunde, junge Mäuse verwendet, in welchen durch eine einmalige Unterbindung der renalen Blutversorgung, ein akutes Nierenversagen ausgelöst wurde. Im klinischen Alltag sind es jedoch vor allem ältere Patienten mit multiplen Komorbiditäten, welche ein akutes Nierenversagen erleiden. Mit den möglichen vorbestehenden Risikofaktoren wie Diabetes, Bluthochdruck und Alter sind Veränderungen der renalen Struktur, Hämodynamik und der Immunreaktion assoziiert. Damit kann unser Model die klinische Realität nicht exakt widerspiegeln [102]. Ebenso unrealistisch im klinischen Alltag ist das unilaterale akute Nierenversagen im Menschen, wie es hier im Model simuliert wurde. Um einen direkten Vergleich zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Niere in der selben Maus haben zu können, wurde dieses Model trotz der damit verbundenen Einschränkungen ausgewählt. Desweiteren zeigten Erfahrungen aus Vorversuchen, dass die unilaterale Ischämie/Reperfusion weniger belastend für die Tiere ist. Sie waren postoperativ schneller wieder mobil und sichtbar fitter als die bilateral operierten Mäuse. Auch die strenge Unterscheidung von proinflammatorischen M1 und profibrotischen M2 Makrophagen ist eine stark vereinfachte Modellannahme, welche im klinischen Setting aufgrund der hohen Plastizität der Makrophagen und dem Einfluss der multiplen Umweltfaktoren so nicht existiert [51]. So ist die Pathogenese des chronisch-auf-akuten Nierenversagens im Menschen höchstwahrscheinlich wesentlich komplexer und neben TNF- $\alpha$  existieren weitere, wichtige Mediatoren. Um dies genauer zu ergründen, ist eine weitere Forschung mit besser angepassten Modellen dringend nötig, wobei die vorliegenden Daten, als Grundlage hierfür dienen können.

## **Kapitel 5**

### **Zusammenfassung**



### 5 Zusammenfassung

Klinische Studien konnten belegen, dass Patienten mit einem akuten Nierenversagen ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz haben, wobei der Pathomechanismus bisher weitestgehend unbekannt ist. In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde der Einfluss der Makophagen-vermittelten Entzündungsreaktion auf die Niere nach einem ischämischen ANV untersucht. Hierfür untersuchten wir die Wirkung von IRAK M, einem negativen Regulator der TLR/IL-1R Signalübertragung, auf den Phänotyp der Makrophagen und deren Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit der postischämischen Niere. Die dabei zu überprüfende Hypothese besagte, dass die durch eine IRAK M-Defizienz vermehrt vorkommenden, proinflammatorischen Makrophagen, durch die Vermittlung einer anhaltenden Entzündung, zur Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens führen.

IRAK M zeigte eine hohe basale mRNA Expression in der Niere. Aus der Niere isolierte CD11b+ Immunzellen und eine Makrophagen-Zelllinie zeigten nach Stimulation mit LPS eine erhöhte Expression von IRAK M. Zur Induktion eines akuten Nierenversagens wurde an den Versuchsmäusen eine unilaterale Abklemmung der Nierengefäße durchgeführt, was einen Ischämie/Reperfusions-Schaden auslöste. Die Menge an IRAK M mRNA war in den postischämischen Nieren 1, 5 und 10 Tage nach der Operation erhöht, was zurückgeht auf eine verstärkte Expression in renalen Immunzellen. Aus Vorarbeiten war bekannt, dass die IRAK M-Defizienz keinen Einfluss auf die Nierenfunktion und -morphologie, sowie die Invasion von Immunzellen in den ersten 24 Stunden nach dem initialen ANV hat. Deshalb entwickelten wir ein Langzeitmodell, um den Einfluss von IRAK M auf die Regeneration in einer späteren Phase untersuchen zu können. 5 Wochen nach der Operation zeigten Wildtyp-Mäuse zeigten ab einer Ischämiezeit von 90 Minuten atrophische Nieren mit der erhöhten Expression von proinflammatorischen und profibrotischen Markern. Mit einer Ischämiezeit von 45 Minuten entwickelte sich dieser Phänotyp des chronischen Nierenversagens nicht und wir konnten die Wildtyp-Mäuse als gesunde Kontrollen für die weiteren Experimente mit den IRAK M-defizienten Mäusen verwenden. IRAK M zeigte drei Wochen nach der Operation in den gesunden postischämischen Wildtypnieren die höchste Expression. Im Gegensatz zu den vollständig ausgeheilten Nieren des Wildtyps hatten die postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse 5 Wochen postoperativ signifikant an Substanz verloren. Die genaue Untersuchung dieser Schrumpfnieren zeigte einen Verlust von proximalen Tubulussegmenten und eine erhöhte Dichte atubulärer Glomeruli in der Nierenrinde. Die reduzierte Expression von E-Cadherin in den IRAK M-defizienten Nieren ließ uns vermuten, dass eine verminderte Proliferation

der überlebenden Epithelzellen einen Anteil an der Schrumpfnierenbildung hatte. Des weiteren wiesen die atrophierten Nieren einen erhöhten Gehalt an extrazellulärer Matrix auf und wir konnten eine vermehrte Expression an profibrotischen Markern finden. Auch proinflammatorische Marker waren in den postischämischen Nieren der IRAK M-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp erhöht, was für eine chronische Entzündungsreaktion spricht. Da wir zeigen konnten, dass IRAK M durch den Ischämie/Reperfusionsschaden in Makrophagen hochreguliert wird, legten wir den Fokus für weitere Untersuchungen auf diese Zellen. Die Schrumpfnieren zeigten eine verstärkte Infiltration von Makrophagen, wohingegen in den Wildtypnieren fünf Wochen nach der Operation kaum noch Makrophagen nachweisbar waren. Eine genauere Charakterisierung der Zellen in den postischämischen Nieren beider Genotypen mittels Durchflusszytometrie, zeigte einen erhöhten Anteil der CD45<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen in den IRAK M-defizienten Nieren. Außerdem war die Fraktion der klassisch aktivierten proinflammatorischen M1 Makrophagen in den IRAK M-defizienten Nieren signifikant erhöht. Ebenso war die mRNA Expression von für M1 Makrophagen typischen Markern erhöht wohingegen die Expression M2-typischer mRNA keinen Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen und IRAK M-defizienten Mäusen zeigte. In dem letzten Experiment verwendeten wir Etanercept um die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  zu blockieren. Hierfür erhielten IRAK M-defiziente Mäuse nach der Operation mehrmalige Dosen des Medikaments. Die Untersuchung der Nieren fünf Wochen später zeigte in der Therapiegruppe einen signifikant geringeren Gewichtsverlust der Niere, mehr proximale Tubulussegmente und weniger Fibrose in den postischämischen Nieren im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche nur Kochsalz erhielt.

Aus den gesammelten Daten ergeben sich wichtige Erkenntnisse in der Pathogenese des chronisch-auf-akuten Nierenversagens. Eine anhaltende Entzündungsreaktion, mit der vermehrten Produktion und Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , verhindert die vollständige Regeneration der Niere nach einem akuten Nierenversagen. Die Auflösung der Entzündung ist ein aktiver Prozess. Intrarenale Makrophagen benötigen hierfür IRAK M, um nach der ischämischen akuten Nierenschädigung eine dauerhafte Polarisierung zu einem proinflammatorischen M1 Phänotyp zu unterdrücken. IRAK M hat demnach Einfluss auf die Wundheilung und ohne IRAK M entwickelt sich ein chronischer Nierenschaden mit dem Verlust von proximalen Tubulussegmenten, der Bildung atubulärer Glomeruli und einem vermehrten Gehalt an interstitieller Fibrose. Die IRAK M-Defizienz ist ein genetischer Risikofaktor für das chronisch-auf-akute Nierenversagen und die betroffenen Patienten benötigen eine gezielte Prophylaxe und Nachsorge. Außerdem kann die pharmakologische Inhibition der proinflammatorischen Signalübertragung ein chronisch-auf-akutes Nierenversagen verbessern und weitere, gezielte Forschung auf dem Gebiet der Makrophagen-Polarisierung ist erstrebenswert.

## **Kapitel 6**

### **Literaturverzeichnis**

## 6 Literaturverzeichnis

1. Chawla, L.S., et al., *Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes*. N Engl J Med, 2014. **371**(1): p. 58-66.
2. Chawla, L.S. and P.L. Kimmel, *Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome*. Kidney Int, 2012. **82**(5): p. 516-24.
3. Levy, E.M., C.M. Viscoli, and R.I. Horwitz, *The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis*. Jama, 1996. **275**(19): p. 1489-94.
4. Metnitz, P.G., et al., *Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients*. Crit Care Med, 2002. **30**(9): p. 2051-8.
5. Druml, W., *Acute renal failure is not a "cute" renal failure!* Intensive Care Med, 2004. **30**(10): p. 1886-90.
6. Van Biesen, W., R. Vanholder, and N. Lameire, *Defining acute renal failure: RIFLE and beyond*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(6): p. 1314-9.
7. Singbartl, K. and J.A. Kellum, *AKI in the ICU: definition, epidemiology, risk stratification, and outcomes*. Kidney Int, 2012. **81**(9): p. 819-25.
8. Khwaja, A., *KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury*. Nephron Clin Pract, 2012. **120**(4): p. c179-84.
9. Okusa, M.D. and A. Davenport, *Reading between the (guide)lines--the KDIGO practice guideline on acute kidney injury in the individual patient*. Kidney Int, 2014. **85**(1): p. 39-48.
10. Lameire, N., W. Van Biesen, and R. Vanholder, *Acute renal failure*. Lancet, 2005. **365**(9457): p. 417-30.
11. Abuelo, J.G., *Normotensive ischemic acute renal failure*. N Engl J Med, 2007. **357**(8): p. 797-805.
12. Bonventre, J.V. and L. Yang, *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4210-21.
13. Kwon, O., S.M. Hong, and G. Ramesh, *Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. **296**(1): p. F25-33.
14. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, *KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*. Kidney inter., 2012. **Suppl. 2013**(3): p. 1-150.
15. Herold, G., *Innere Medizin*. 2015, Köln.
16. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie. 29.07.2015]; Available from: <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich>.
17. Levey, A.S., et al., *A new equation to estimate glomerular filtration rate*. Ann Intern Med, 2009. **150**(9): p. 604-12.
18. Chadban, S.J., et al., *Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(7 Suppl 2): p. S131-8.
19. Chen, J., et al., *Prevalence of decreased kidney function in Chinese adults aged 35 to 74 years*. Kidney Int, 2005. **68**(6): p. 2837-45.
20. Hsu, C.C., et al., *High prevalence and low awareness of CKD in Taiwan: a study on the relationship between serum creatinine and awareness from a nationally representative survey*. Am J Kidney Dis, 2006. **48**(5): p. 727-38.
21. Goncalves, G.M., et al., *New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries*. Scand J Immunol, 2011. **73**(5): p. 428-35.
22. Ibrahim, H.N., et al., *Long-term consequences of kidney donation*. N Engl J Med, 2009. **360**(5): p. 459-69.
23. Garg, A.X., et al., *Albuminuria and estimated GFR 5 years after Escherichia coli O157 hemolytic uremic syndrome: an update*. Am J Kidney Dis, 2008. **51**(3): p. 435-44.

24. Spurney, R.F., W.J. Fulkerson, and S.J. Schwab, *Acute renal failure in critically ill patients: prognosis for recovery of kidney function after prolonged dialysis support*. Crit Care Med, 1991. **19**(1): p. 8-11.
25. Hsu, C.Y., *Yes, AKI truly leads to CKD*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(6): p. 967-9.
26. Lo, L.J., et al., *Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease*. Kidney Int, 2009. **76**(8): p. 893-9.
27. Wald, R., et al., *Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis*. Jama, 2009. **302**(11): p. 1179-85.
28. Ishani, A., et al., *Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(1): p. 223-8.
29. Askenazi, D.J., et al., *3-5 year longitudinal follow-up of pediatric patients after acute renal failure*. Kidney Int, 2006. **69**(1): p. 184-9.
30. Okusa, M.D., G.M. Chertow, and D. Portilla, *The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(3): p. 520-2.
31. Chawla, L.S., *Acute kidney injury leading to chronic kidney disease and long-term outcomes of acute kidney injury: the best opportunity to mitigate acute kidney injury?* Contrib Nephrol, 2011. **174**: p. 182-90.
32. Bonventre, J.V. and A. Zuk, *Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?* Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 480-5.
33. Yang, L., B.D. Humphreys, and J.V. Bonventre, *Pathophysiology of acute kidney injury to chronic kidney disease: maladaptive repair*. Contrib Nephrol, 2011. **174**: p. 149-55.
34. Murphy, K., *Janeway's immunobiology 8th edition*. 2012, New York: Garland Science.
35. Vollmar, A., I. Zündorf, and T. Dingermann, *Immunologie*. 2013, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.
36. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
37. Hubbard, L.L. and B.B. Moore, *IRAK-M regulation and function in host defense and immune homeostasis*. Infect Dis Rep, 2010. **2**(1).
38. Lin, Q., et al., *The essential roles of Toll-like receptor signaling pathways in sterile inflammatory diseases*. Int Immunopharmacol, 2011. **11**(10): p. 1422-32.
39. Valles, P.G., et al., *Acute kidney injury: what part do toll-like receptors play?* Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014. **7**: p. 241-51.
40. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
41. Kobayashi, K., et al., *IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling*. Cell, 2002. **110**(2): p. 191-202.
42. Jain, A., S. Kaczanowska, and E. Davila, *IL-1 Receptor-Associated Kinase Signaling and Its Role in Inflammation, Cancer Progression, and Therapy Resistance*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 553.
43. Wang, N., H. Liang, and K. Zen, *Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 614.
44. del Fresno, C., et al., *Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4*. J Immunol, 2005. **174**(5): p. 3032-40.
45. van 't Veer, C., et al., *Induction of IRAK-M is associated with lipopolysaccharide tolerance in a human endotoxemia model*. J Immunol, 2007. **179**(10): p. 7110-20.
46. Deng, J.C., et al., *Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M*. J Clin Invest, 2006. **116**(9): p. 2532-42.
47. Lech, M., et al., *Interleukin-1 receptor-associated kinase-M suppresses systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 2011. **70**(12): p. 2207-17.

48. Li, H., et al., *IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation*. J Exp Med, 2005. **201**(7): p. 1169-77.
49. Seki, M., et al., *Critical role of IL-1 receptor-associated kinase-M in regulating chemokine-dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1410-8.
50. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
51. Anders, H.J. and M. Ryu, *Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis*. Kidney Int, 2011. **80**(9): p. 915-25.
52. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 317-26.
53. Wang, Y. and D.C. Harris, *Macrophages in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(1): p. 21-7.
54. Allam, R., et al., *Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(8): p. 1375-88.
55. Lech, M. and H.J. Anders, *Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(7): p. 989-97.
56. Mulay, S.R., et al., *MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice*. Kidney Int, 2012. **81**(12): p. 1199-211.
57. Wu, H., et al., *TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2847-59.
58. Savill, J., *Apoptosis in resolution of inflammation*. J Leukoc Biol, 1997. **61**(4): p. 375-80.
59. Day, Y.J., et al., *Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **288**(4): p. F722-31.
60. Jo, S.K., et al., *Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(5): p. 1231-9.
61. Jang, H.S., et al., *Infiltrated macrophages contribute to recovery after ischemic injury but not to ischemic preconditioning in kidneys*. Transplantation, 2008. **85**(3): p. 447-55.
62. Wang, Y., et al., *Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease*. Kidney Int, 2007. **72**(3): p. 290-9.
63. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati, *New vistas on macrophage differentiation and activation*. Eur J Immunol, 2007. **37**(1): p. 14-6.
64. Lech, M., et al., *Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(2): p. 292-304.
65. Pfizer medical information. 11.08.2015]; Available from: <https://www.pfizermed.de/medikamente/medikamente-a-bis-z/enbrelr-2550-mg-fertigspritze.htm>.
66. Arzneistoffe von A-Z. 24.08.2015]; Available from: <http://www.arzneistoffe.net/Etanercept.html>.
67. Miltenyi Biotec GmbH. 11.08.2015]; Available from: [http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer\\_en/680/MACS\\_Technology\\_Flyer.pdf](http://www.miltenyibiotec.com/download/flyer_en/680/MACS_Technology_Flyer.pdf).
68. Carl Roth GmbH + Co. KG. [cited 11.08.2015; Available from: [https://www.carlroth.com/at/de/Chemikalien/A-Z-Chemikalien/M/Masson-Goldner-Trichrom-F%C3%A4rbekit/Masson-Goldner-Trichrom-F%C3%A4rbekit/p/000000080001cc5f00040023\\_deCarl](https://www.carlroth.com/at/de/Chemikalien/A-Z-Chemikalien/M/Masson-Goldner-Trichrom-F%C3%A4rbekit/Masson-Goldner-Trichrom-F%C3%A4rbekit/p/000000080001cc5f00040023_deCarl)
69. Oliver, J., D.M. Mac, and A. Tracy, *The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury; renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode*. J

- Clin Invest, 1951. **30**(12:1): p. 1307-439.
70. Holzapfel, B. and L. Wickert, *Biologie in unserer Zeit*. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. 2007, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.
71. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
72. Renz, H., *Praktische Labordiagnostik*. 2014, Berlin: Walter de Gruyter GmbH.
73. Ko, G.J., et al., *Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(3): p. 842-52.
74. Basile, D.P., et al., *Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(5): p. F887-99.
75. Lasagni, L., et al., *Podocyte mitosis - a catastrophe*. Curr Mol Med, 2013. **13**(1): p. 13-23.
76. Pagtalunan, M.E., et al., *Late consequences of acute ischemic injury to a solitary kidney*. J Am Soc Nephrol, 1999. **10**(2): p. 366-73.
77. Oliver, J. and A. Luey, *Plastic studies in abnormal renal architecture*. Arch Pathol, 1935.
78. Chevalier, R.L. and M.S. Forbes, *Generation and evolution of atubular glomeruli in the progression of renal disorders*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(2): p. 197-206.
79. Pagtalunan, M.E., et al., *Atubular glomeruli in patients with chronic allograft rejection*. Transplantation, 1996. **61**(8): p. 1166-71.
80. Biswas, A., et al., *Negative regulation of Toll-like receptor signaling plays an essential role in homeostasis of the intestine*. Eur J Immunol, 2011. **41**(1): p. 182-94.
81. Balaci, L., et al., *IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(6): p. 1103-14.
82. Tan, Q., et al., *IRAK-M deficiency promotes the development of type 1 diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2014. **63**(8): p. 2761-75.
83. Lassen, S., et al., *Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1976-83.
84. Lech, M., et al., *Resident dendritic cells prevent postischemic acute renal failure by help of single Ig IL-1 receptor-related protein*. J Immunol, 2009. **183**(6): p. 4109-18.
85. Swaminathan, S. and M.D. Griffin, *First responders: understanding monocyte-lineage traffic in the acutely injured kidney*. Kidney Int, 2008. **74**(12): p. 1509-11.
86. Wermuth, P.J. and S.A. Jimenez, *The significance of macrophage polarization subtypes for animal models of tissue fibrosis and human fibrotic diseases*. Clin Transl Med, 2015. **4**: p. 2.
87. Stramer, B.M., R. Mori, and P. Martin, *The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(5): p. 1009-17.
88. Hopkinson-Woolley, J., et al., *Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and foetal mouse*. J Cell Sci, 1994. **107** ( Pt 5): p. 1159-67.
89. Lee, S.B. and R. Kalluri, *Mechanistic connection between inflammation and fibrosis*. Kidney Int Suppl, 2010(119): p. S22-6.
90. Sindrilaru, A., et al., *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 985-97.
91. Boor, P., T. Ostendorf, and J. Floege, *Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets*. Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(11): p. 643-56.
92. Nishida, M. and K. Hamaoka, *Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy*. Nephron Exp Nephrol, 2008. **110**(1): p. e31-6.
93. Humphreys, B.D., et al., *Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(3): p. 284-91.

94. Yang, L., et al., *Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury*. Nat Med, 2010. **16**(5): p. 535-43, 1p following 143.
95. Ishani, A., et al., *The magnitude of acute serum creatinine increase after cardiac surgery and the risk of chronic kidney disease, progression of kidney disease, and death*. Arch Intern Med, 2011. **171**(3): p. 226-33.
96. Chawla, L.S., et al., *The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease*. Kidney Int, 2011. **79**(12): p. 1361-9.
97. Ma, X. and S. Xu, *TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis*. Biomed Rep, 2013. **1**(2): p. 177-184.
98. Kivelevitch, D., B. Mansouri, and A. Menter, *Long term efficacy and safety of etanercept in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis*. Biologics, 2014. **8**: p. 169-82.
99. Shen, C., et al., *Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **21**(3): p. 251-8.
100. Wilson, H.M., et al., *Inhibition of macrophage nuclear factor-kappaB leads to a dominant anti-inflammatory phenotype that attenuates glomerular inflammation in vivo*. Am J Pathol, 2005. **167**(1): p. 27-37.
101. Ranganathan, P.V., C. Jayakumar, and G. Ramesh, *Netrin-1-treated macrophages protect the kidney against ischemia-reperfusion injury and suppress inflammation by inducing M2 polarization*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **304**(7): p. F948-57.
102. S.N. Heyman et al. *In vivo models of acute kidney injury*. Drug Discov Today: Dis Model (2010), doi:10.1016/j.ddmod.2010.07.001



## **Kapitel 7**

### **Abkürzungsverzeichnis**

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ADQI	acute dialysis quality initiative
AKIN	acute kidney injury network
APS	Ammoniumpersulfat
ANV	Akutes Nierenversagen
Arg 1	arginase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL 2	CC-Motiv-Chemokin-Ligand 2
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary-Desoxyribonukleinsäure
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CTGF	connective tissue growth factor
CXCL10	C-X-C-Motiv-Chemokin 10
DAMP	damage associated molecular pattern
DD	death domain
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESRD	end stage renal disease
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FSP 1	fibroblast-specific protein 1
g	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde (hour)
IKK	inhibitor of NF-kappa-B
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin 1 receptor
INF	Interferon

iNOS	inducible nitric oxide synthase
IR	Ischämie/Reperfusion
IRAK	Interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	interferon regulatory factor
KDIGO	kidney disease: improving global outcomes
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Kontralaterale Niere
LLR	leucine rich repeats
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6C	lymphocyte antigen 6C
m	Meter
M	Stoffmengenkonzentration in Mol / Liter
MACS	magnetic activated cell sorting
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	Messenger RNA
MR	mannose receptor
MyD88	myeloid differentiation factor 88
NF- $\kappa$ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGAL	neutrophil gelatinase-associated lipocalin
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PGE 1	Prostaglandin E1
PRR	pattern recognition receptors
PS	Penicillin-Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	real time PCR
SEM	Standard error of the mean
TAB	TAK 1 binding protein
TAK 1	TGF-beta-activated kinase 1
TGF $\beta$	transforming growth factor beta
TIR	Toll-interleukin-1-receptor

TIRAP	TIR-associated protein
TLR	Toll like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor alpha
TRAF 6	tumor necrosis factor receptor associated factor 6
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain containing adaptor protein-inducing IFN-gamma
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (unit)
UBC 13	Ubiquitin-conjugating enzyme 13
UEV1A	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1

## **Kapitel 8**

### **Danksagung**

### 8 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders bedanken. Er hat mir das spannende Thema für die vorliegende Dissertation vorgeschlagen und es mir ermöglicht, selbstständig Experimente in seinem Forschungslabor durchzuführen. Als Mentor hat er mich bei der Bearbeitung der Fragestellung mit wertvollen Hinweisen und Vorschlägen unterstützt und es dabei stets verstanden mich zu motivieren. Durch ihn konnte ich einen fundierten Einblick in die Tätigkeit der wissenschaftlichen Arbeit erlangen.

Zudem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Heesemann für die Organisation und die Aufnahme in das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München und die damit verbundene fachliche und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech. Er hat mich bei meiner experimentellen Arbeit unterstützt und war jederzeit ein fachlich kompetenter und äußerst hilfreicher Ansprechpartner. Er war während meiner Zeit im Labor ein Freund und ist es bis heute geblieben. Für all seine Unterstützung danke ich ihm von Herzen.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle bei Frau Dr. hum. biol. Mi Ryu bedanken, die mich in der Durchführung der Durchflusszytometrie fachlich unterstützt hat. Bei Herrn Dan Draganovici und Frau Janina Mandelbaum möchte ich für die Anfertigung der histologischen Schnitte, sowie der Hilfe mit dem Mikroskop danken.

Ein weiterer, besonderer Dank gilt Frau Heni Eka Susanti für die technische Unterstützung in der Laborarbeit und die liebevolle Freundschaft, die in dieser Zeit entstanden ist. Desweiteren danken möchte ich, Frau Dr. med. Ph.D. Dana Thomasova, Herrn Dr. hum. biol. Onkar Kulkarni, Herrn Shrikant Ramesh Mulay, Herrn Narayana Murthy Darisipudi, Frau Ewa Radomska und den zahlreichen weiteren Doktoranden für die großartige Unterstützung.

Die AG Anders besteht aus vielen Mitarbeitern, die mir alle ans Herz gewachsen sind. Ich habe die Zeit im Labor sehr genossen und möchte mich auch bei allen nicht namentlich genannten dafür bedanken.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Dabei ganz besonders bei meinen Eltern Max und Silvia Gröbmayer. Sie haben mich in allen meinen Entscheidungen unterstützt und mir stets helfend zur Seite gestanden.